

**Die pharmazeutische Verwendung von Einschlussverbindungen
der Desoxycholsäure unter besonderer Berücksichtigung der
Applikation und der Physiologischen Verfügbarkeit**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im

Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
HELMUT LIX
aus München

Berlin 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Die pharmazeutische Verwendung von Einschlussverbindungen
der Desoxycholsäure unter besonderer Berücksichtigung der
Applikation und der Physiologischen Verfügbarkeit**

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung der Doktorwürde

im

Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

HELMUT LIX

aus München

Berlin 1973

1. Referent: Prof. Dr.K.-H. Frömming

2. Referent: Prof. Dr. M. Wenzel



Tag der mündlichen Prüfung:

14.6.1973

Tag der Promotion:

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming danke ich aufrichtig für die Ueberlassung des Themas, seine stets wohlwollende Hilfe und grosszügige Unterstützung sowie für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich im Zusammenhang mit der Arbeit ergaben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I.	Einleitung und Problemstellung 1
II.	Allgemeiner Teil 9
1.	Abhängigkeit der Physiologischen Verfügbarkeit der Salicylsäure- Choleinsäure von der Teilchengrösse 9
1.1.	In vitro Löslichkeit in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche 9
1.2.	Exkretionsuntersuchungen am Menschen nach peroraler Applikation 22
2.	Anwendung des "Buccal-Tests" nach Beckett und Triggs auf Salicyl- säure-Choleinsäure 27
2.1.	Zusammenhänge zwischen Resorption und Exkretion und neueren in vitro Methoden 27
2.2.	Die Bedeutung der Lipoidlöslich- keit für die Arzneistoffresorption 28
2.3.	"Buccal-Test" nach Beckett und Triggs 29
3.	Das Verhalten von Salicylsäure- Choleinsäure in verschiedenen Salbengrundlagen 34
3.1.	Liberation des Wirkstoffes aus dem Addukt und Resorption des Wirkstoffes 35
3.2.	In vitro Untersuchungen über die Wirkstofffreisetzung in Salbengrundlagen 35
3.2.1.	Wirkstofffreisetzung aus Salicylsäure-Salben 39
3.2.2.	Wirkstofffreisetzung aus Salicylsäure-Choleinsäure-Salben 39
3.2.3.	Wirkstofffreisetzung aus Salben mit Salicylsäure und Desoxychol- säure als physikalischem Gemisch 42

3.2.4.	Freigabe der Gastkomponente aus dem Addukt nach Lagerung in verschiedenen Salbengrundlagen	44
3.3.	Resorptionsbeeinflussende Faktoren bei epikutaner Applikation	47
3.4.	In vivo Absorption und Elimination aus Emulsionsgrundlagen	50
3.4.1.	In vivo Absorption aus Salicylsäure-Salben	52
3.4.2.	In vivo Absorption aus Salicylsäure-Choleinsäure-Salben	56
3.4.3.	In vivo Absorption aus Salben mit Salicylsäure und Desoxycholsäure als physikalischem Gemisch	56
4.	Resorption der Gastkomponente nach rektaler Applikation	58
5.	Diskussion und Zusammenfassung	66
III.	Experimenteller Teil	70
1.	Darstellung der Salicylsäure-Choleinsäure	70
2.	Zerkleinerungsverfahren	70
3.	Bestimmung der spezifischen Oberfläche	71
4.	"Dissolution Test" nach Levy	71
5.	"Half-Change" Methode nach Münzel	72
6.	Exkretionsuntersuchungen nach peroraler Applikation	72
6.1.	Versuchspersonen	72
6.2.	Einnahme und Harnentnahme	73
6.3.	Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn	73

	Seite
7.	"Buccal-Test" nach Beckett und Triggs 74
7.1.	Herstellung der Stammlösungen 74
7.2.	Applikation und Aufbereitung der Proben 74
7.3.	Gehaltsbestimmung der Buccalflüssigkeit 75
8.	Untersuchungen an Salben 75
8.1.	Verwendete Salbengrundlagen 75
8.2.	Herstellung der Salben 75
8.3.	Diffusionskammer und Messung der Arzneistofffreigabe in vitro 76
8.4.	Bestimmung der freien Salicylsäure in der Salbe 77
8.5.	Lagerung der Salben 77
8.6.	Versuchspersonen 78
8.7.	Applikation und Harnentnahme 78
8.8.	Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn 78
9.	Rektale Applikation 79
9.1.	Herstellung der Suppositorien 79
9.2.	Gehaltsbestimmung der Suppositorien 79
9.3.	Applikation und Harnentnahme 79
9.4.	Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn 80
IV.	Literaturverzeichnis 82

I. Einleitung und Problemstellung

Einschlussverbindungen entstehen durch die räumliche Einlagerung von Gastmolekülen in von meist mehreren Wirtsmolekülen gebildete Hohlräume. Hierbei handelt es sich nach Cramer (1) um eine rein räumliche Verbindungsbildung zwischen den Partnern. Es werden keinerlei Haupt- oder Nebervalenzen hergestellt. Das umgebende Molekül schliesst das Gastmolekül nach aussen ab, wobei die Gastkomponente manchmal mehr oder weniger Bewegungsfreiheit besitzt, manchmal in definierten Punktlagen fixiert ist. Der benötigte Hohlraum kann sich entweder in einem einzelnen Wirtsmolekül befinden, oder er kann durch Zusammentreten mehrerer derartiger Moleküle entstehen, die dann ein hohlraumhaltiges Gitter bilden. Das betreffende Hohlraumgitter bildet sich meist erst in Anwesenheit des Gastmoleküls aus und ist im allgemeinen nur in dessen Gegenwart stabil. In einigen Fällen jedoch ist ein Entfernen der Gastkomponente möglich, ohne daß eine Zerstörung des Gitters resultiert. Ein Beispiel hierfür sind die Moleküleinschlussverbindungen der Cyclodextrine.

Für die Gitterhohlräume sind drei Arten der geometrischen Umgrenzung möglich:

Sie können einmal dreidimensional von allen Seiten umschlossen und damit käfigartig gestaltet sein, sie können in einer Dimension geöffnet sein, was der Ausbildung von Kanälen entspricht, und sie können nach zwei Dimensionen offen und damit schichtförmig sein.

Schlenk jr. (2) teilt dementsprechend die Einschlussverbindungen ein in:

1. Kanal- Einschlussverbindungen, z.B. Harnstoff-, Thioharnstoff-, Desoxycholsäure- und Cyclo-dextrin-Addukte.
2. Käfig-Einschlussverbindungen, z.B. Hydrochinon-Clathrate, Dicyano-amin-benzolnickel- und Wasser-Käfigverbindungen.
3. Schicht-Einschlussverbindungen, z.B. Tonmineralsorbate, basische Zinksalze organischer Säuren, Pferde-methämoglobin-hydrat.

Als Voraussetzung für die Bildung von Einschlussverbindungen nennt Cramer (1) :

1. Der einschliessende Stoff muss Hohlräume von molekularen Dimensionen der Gastkomponente aufweisen. Die Hohlräume bilden sich jedoch oft erst in Gegenwart des Addenden aus.
2. Das räumliche Ineinanderpassen der Partner spielt die entscheidende Rolle, es tritt an die Stelle des Reaktionsvermögens.

Da die Bildungsenergie der Einschlussverbindungen sehr niedrig ist - Schlenk jr. (3) findet 5-10 kcal/Mol für Harnstoffeinschlüsse, Broser und Lautsch (4) geben 12 kcal/Mol bei Cyclodextrinaddukten an - handelt es sich nach Gawalek (5) hauptsächlich um van der Waalssche Kräfte. Infolge der räumlich angreifenden Kräfte liegen

die eingeschlossenen Moleküle dennoch in einem aussergewöhnlich starken Kraftfeld. Dementsprechend liegen z.B. die Schmelzpunkte der Desoxycholsäure-Einschlüsse höher als die ihrer Komponenten.

Absorptionsspektren, das Normalredoxpotential und die chemische Reaktionsfähigkeit können durch den Einschluss verändert werden. So fanden Frömming und Sandmann (6) beim Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt im IR-Spektrum eine nicht assoziierte OH-Valenzschwingung bei 3575 cm^{-1} , die weder bei den Komponenten allein noch bei anderen Addukten auftritt. Cramer (7) beschreibt bei Arbeiten mit p-Nitrophenol im Dextrinaddukt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 320 nm nach 430 nm, die er als eine Lockerung des Elektronensystems deutet. Die Absorptionsspektren von Jod- α -Dextrin-Addukten weisen nach Cramer eine starke Intensivierung und Verschiebung nach längeren Wellenlängen auf. Scheibe und Brück (8) berichten über Beeinflussung der Absorptionsspektren durch van der Waalssche Kräfte. Frömming und Weyermann (9) fanden bei stark oxydativ empfindlichen Stoffen wie Ascaridol und Chaulmoograsäureäthylester nach dem Einschluss in Cyclodextrin völlige Stabilität gegenüber Luftsauerstoff.

Frömming und Mitarbeiter (10-13) veröffentlichten ausführliche Untersuchungen über einige Kanaleinschlussverbindungen, mit besonderer Berücksichtigung der Stabilität und der pharmazeutischen Verwendung. Ebenfalls zur Gruppe der Kanaleinschlussverbindungen zählen die Addukte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirtssubstanz, der Desoxycholsäure.

Im Jahre 1916 erkannten Wieland und Sorge (14), dass die 1885 von Latschinoff (15) aus Galle isolierte Choleinsäure in Wirklichkeit ein Kombinationsprodukt aus 1 Mol Fettsäure und 2 Mol Desoxycholsäure ist. Sie fanden weiterhin, dass sich die Desoxycholsäure nicht nur mit der in der Galle befindlichen Palmitin- und Stearinsäure, sondern auch mit vielen anderen Fettsäuren zusammenlagern kann, wobei das Molverhältnis der Addukte von der Kettenlänge der Paraffincarbonsäuren abhängt. In der Folgezeit gelang es, eine ganze Reihe solcher Addukte der Desoxycholsäure herzustellen, wobei ausser Fettsäuren auch andere organische Substanzen wie Xylol Naphthalin, Benzoesäure usw. eingeschlossen wurden. Als gemeinsamer Oberbegriff verblieb diesen Verbindungen die Bezeichnung Choleinsäuren.

In der folgenden Tabelle sind einige Verbindungen aufgeführt, die in der Lage sind, mit Desoxycholsäure Einschlüsse zu bilden.

Aliphatische Kohlenwasserstoffe	n-Pentan bis n-Decan, geradkettig und verzweigt (16) n-Undecan bis n-Tritetracontan (17)
Alkohole	n-Octylalkohol, n-Tetradecylalkohol (18) Chaulmoograalkohol (19), Vitamin A (20)
Säuren	C ₂ bis C ₂₉ , gesättigt und ungesättigt, cis-trans-Isomere (14,21,22), Benzoesäure (14), Dicarbonsäuren (23)

Ester	Aliphatische Carbonsäuren $C_1 - C_{15}$ mit Alkoholen $C_1 - C_{16}$ (18)
Azo-Verbindungen	p-Aminoazobenzol (24), p-Dimethyl- aminoazobenzol (25,26), o-Aminoazo- toluol, m-Methyl-p-dimethylamino- azobenzol (27), Methylorange (28)
Ketone	Cinnamoylacetone, Dicinnamoylacetone (21), Acetessigester (29,30), Campher (14,31), Carvon (14)
Aromatische Kohlenwasserstoffe	Xylol, Naphtalin, Salol (10), 1,2-Benzanthracen, Methylcholanthren (32), Phenanthren (21,32)
Steroide	Cholesterin (14), Vitamin D_2 und D_3 (33)

Die Annahme von Rheinboldt (34), die Choleinsäuremoleküle seien im Addukt um die Partnermoleküle als Koordinationszentren aufgebaut, widerlegten Kratky und Mitarbeiter (35) anhand von röntgenkristallographischen Untersuchungen. Kratky nahm ein Grundgitter an, das von langen Kanälen durchzogen ist. In diese Hohlräume kann sich die Fettsäure einlagern, wobei längs des Kanals periodisch wiederholt Desoxycholsäure-Elementarzellen angelagert sind. Diese Deutung wurde später von Caglioti und Giacomello (36) mit Hilfe der Fourier-Analyse bestätigt.

Die Elektronendichteprojektion nach Fischmeister (37) (Abb.1) zeigt deutlich die schalenartige Umklammerung der senkrecht aus der Bildebene tretenden Fettsäurekette durch die Desoxycholsäuremoleküle. Ist die Länge der Fettsäurekette grösser als die Breite der Desoxycholsäure-Elementarzelle, so kann ein weiterer Ring, bestehend aus zwei Desoxycholsäuremolekülen angelagert werden.

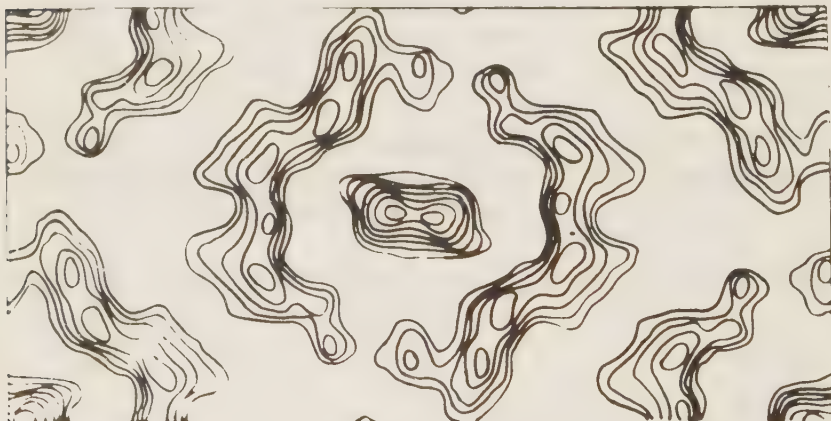


Abb.1: Elektronendichteprojektion nach
Fischmeister (37)

Nach Fischmeister ergibt sich durch Wasserstoffbrücken-
bindung der endständigen Carboxylgruppe mit der
3-ständigen Hydroxylgruppe des gegenüberliegenden
Desoxycholsäuremoleküls der nächsten Elementarzelle
eine spiralförmige Anordnung der Adduktzellen (Abb. 2).

Zahlreiche Arbeiten befassten sich mit der Auswertung
der Verwendungsmöglichkeiten solcher Desoxycholsäure-
Einschlussverbindungen. Bereits Wieland und Sorge (14)

hatten darauf hingewiesen, dass der flüssige Aggregatzustand und der typische Geruch eingeschlossener Fettsäuren im Addukt verloren gehen. Almquist und Klose (38) weisen auf die Selektivität der Desoxycholsäure durch Adduktbildung bei der Isolierung von Vitamin K hin. Shimizu und Hatakeyama (20) bestätigten einem Vitamin-A-Einschluss gute Stabilität gegenüber Licht- und Lufteinwirkung. Frömming und Sandmann (6) fanden, dass durch Einschluss in Desoxycholsäure die pharmazeutische Verarbeitung von oxydations-, licht- und luftempfindlichen Substanzen ohne Stabilitätsverlust möglich wird. Seine weiteren Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Choleinsäuren infolge ihrer Löslichkeit im basischen pH-Bereich geeignet sind, bei peroraler Verabreichung als Retardform Verwendung zu finden.

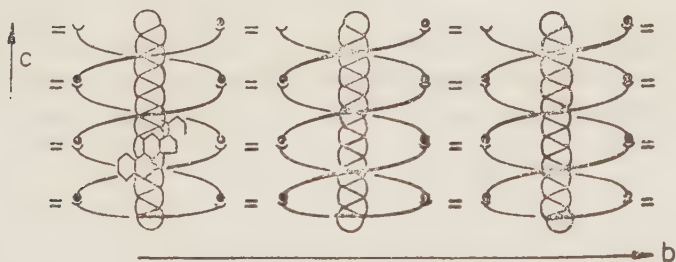


Abb. 2: Spiralige Anordnung der Desoxycholsäure-Moleküle, im Innern eine Fettsäure umschliessend.
(nach Fischmeister , 37 , geändert)



Wasserstoff-Brücken zwischen 3-OH und 24-COOH zweier Desoxycholsäure-Moleküle einer Spirale.



Wasserstoff-Brücken zwischen den Carboxylgruppen der parallel verlaufenden Spiralen.

Die Untersuchungen von Frömming und Sandmann hatten ergeben, dass je nach Dosierung bei Anwendung eines Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukts beim Menschen die Physiologische Verfügbarkeit im Durchschnitt nur bei 74,9 % lag. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass eine nicht quantitative Freisetzung der Gastkomponente aus dem Addukt eingetreten ist. Als Ursache hierfür können zwei Möglichkeiten diskutiert werden. Bei hoher Dosierung von Desoxycholsäure kommt es im Organismus zu einem Flüssigkeitsstrom in das Darmlumen (43,44), was zu einer mehr oder weniger starken Diarrhoe des Probanden führte. Hierbei könnte noch nicht resorbiertes Addukt den Darm unverändert passieren.

Als zweite Möglichkeit käme eine zu geringe spezifische Oberfläche des Adduktes in Betracht, wodurch eine quantitative Freisetzung während der Darmpassage verhindert wird.

Ausserdem sollten diese Untersuchungen einen weiteren Einblick in die mögliche Beeinflussung der Resorption von Wirkstoffen durch Hilfsstoffe in Arzneiformen geben.

II. Allgemeiner Teil

1. Abhängigkeit der Physiologischen Verfügbarkeit der Salicylsäure-Choleinsäure von der Teilchengrösse

1.1. In vitro Löslichkeit in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche

Die Choleinsäure-Einschlussverbindungen zeigen nach Frömming und Sandmann (6) eine pH-abhängige Freigabe der eingeschlossenen Gastkomponente, wie es im " Half-Change " Test nach Münzel (39) am Beispiel der Salicylsäure-Choleinsäure veranschaulicht wurde (Abb. 3).

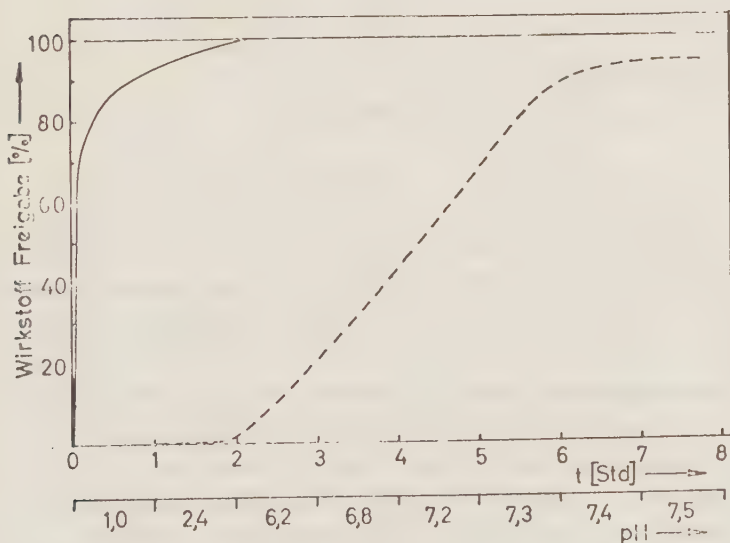


Abb. 3: Salicylsäure-Freigabe aus der Choleinsäure nach der "Half-Change" Methode bei 37° (6)
———— 190 mg Salicylsäure
----- 750 mg Salicylsäure-Choleinsäure

Aus diesem Lösungsverhalten ergibt sich eine Verwendungsmöglichkeit dieser Addukte als magensaftresistente Arzneiform, da sie infolge der Unlöslichkeit der Desoxycholsäure bis zu einem pH von etwa 5,5 weitgehend stabil sind und somit erst zu Beginn der Darmpassage, also im alkalischen Milieu das Pharmakon freigegeben (Abb. 4 und 5)

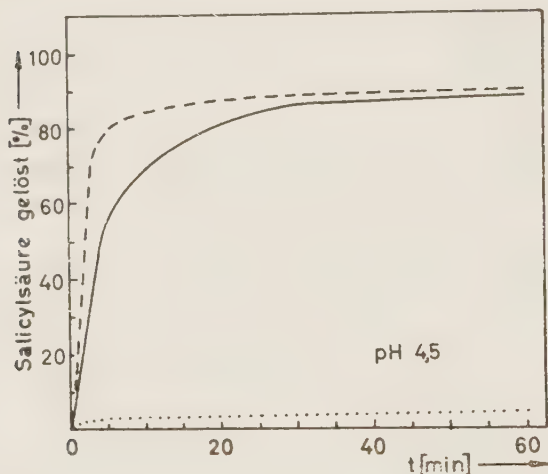


Abb. 4: "Dissolution test" der Salicylsäure-Choleinsäure
pH 4,5 (6)
— 190 mg Salicylsäure
- - - 190 mg Salicylsäure + 560 mg Desoxycholsäure
..... 750 mg Salicylsäure-Choleinsäure

Frömming und Sandmann fanden in vivo bei 10 Versuchspersonen eine Resorption von durchschnittlich 74,9 % der Salicylsäure nach peroraler Verabreichung des Adduktes. Es sollte zunächst in vitro untersucht werden, ob sich durch Vergrößern der spezifischen Oberfläche des Adduktes eine Verbesserung der Freisetzung

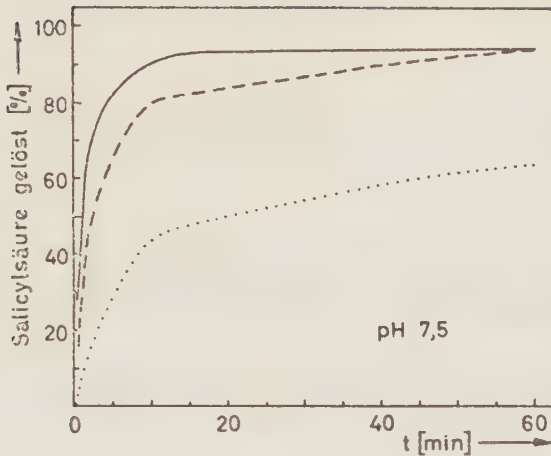


Abb. 5: "Dissolution test" der Salicylsäure-Choleinsäure
pH 7,5 (6)
—— 190 mg Salicylsäure
----- 190 mg Salicylsäure + 560 mg Desoxycholsäure
..... 750 mg Salicylsäure-Choleinsäure

erreichen lässt. Um den Faktor der Korngrösse in die Versuchsergebnisse mit einbeziehen zu können, wurde die Modellsubstanz Salicylsäure-Choleinsäure zur Erreichung unterschiedlicher Korngrössen durch drei verschiedene mechanische Methoden zerkleinert und ihre spezifische Oberfläche nach der BET-Methode mit dem Areameter gemessen.

Es wurden folgende Präparate verwendet:

- I. Mahlgut nach manueller Zerkleinerung mit Mörser und Pistill mit einer spezifischen Oberfläche von $0,84 \text{ m}^2/\text{g}$
- II. Mahlgut nach mechanischer Zerkleinerung in der Kugelmühle mit einer spezifischen Oberfläche von $1,69 \text{ m}^2/\text{g}$
- III. Mahlgut nach Behandlung in der Luftstrahlmühle mit einer spezifischen Oberfläche von $6,46 \text{ m}^2/\text{g}$

Die Salicylsäure wurde als einzuschliessende Gastverbindung auf Grund geeigneter Löslichkeit und leichter analytischer Erfassbarkeit gewählt. Die Freisetzungsgeschwindigkeit der drei in ihrer spezifischen Oberfläche verschiedenen Addukte wurde im "Dissolution test" nach Levy (40) gemessen. Die Abbildungen 6 - 9 zeigen die Lösungsgeschwindigkeiten bei pH 1,0 / 4,5 / 7,5 und 8,5.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich das manuell behandelte Addukt mit einer spezifischen Oberfläche von $0,84 \text{ m}^2/\text{g}$ deutlich langsamer löst, als die in der Kugelmühle zerkleinerte Substanz, deren spezifische Oberfläche $1,69 \text{ m}^2/\text{g}$ beträgt. Noch signifikanter ist die Differenz zwischen den Lösungsgeschwindigkeiten der von Hand verriebenen und der mikronisierten Substanz (spez. Oberfläche $6,46 \text{ m}^2/\text{g}$). Es bestehen auch in den nach einer Stunde gemessenen Lösungsmaxima signifikante Unterschiede.

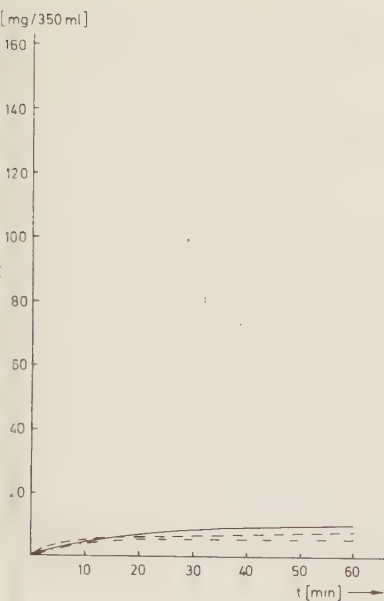


Abb. 6: pH 1,0

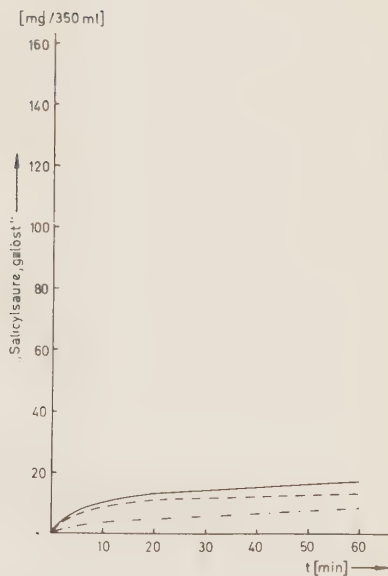


Abb. 7: pH 4,5

Abb. 6 und 7: "Dissolution test" der Salicylsäure-Choleinsäure

-. - . - . -	750 mg Addukt I,	spez. Oberfl. 0,84 m ² /g
-----	750 mg Addukt II,	spez. Oberfl. 1,69 m ² /g
————	750 mg Addukt III,	spez. Oberfl. 6,46 m ² /g

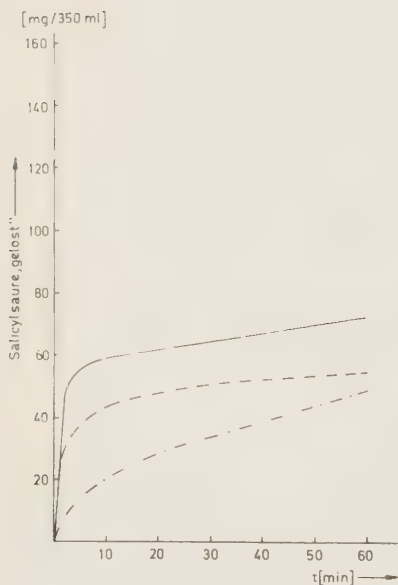


Abb. 8: pH 7,5

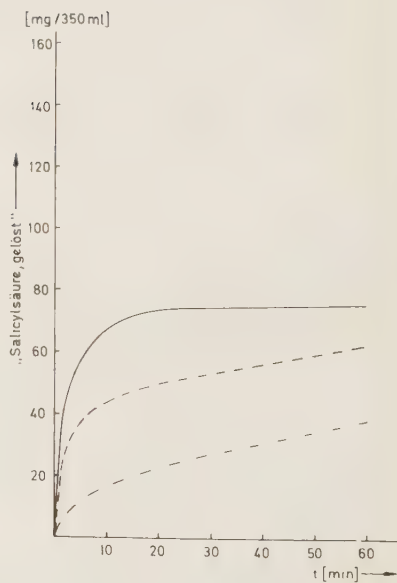


Abb. 9: pH 8,5

Abb. 8 und 9: "Dissolution test" der Salicylsäure-Choleinsäure

---.	750 mg Addukt I,	spez. Oberfl. 0,84 m ² /g
----	750 mg Addukt II,	spez. Oberfl. 1,69 m ² /g
—	750 mg Addukt III,	spez. Oberfl. 6,46 m ² /g

Die Freigabewerte der Salicylsäure aus dem Einschluss liegen bei pH 1,0 sehr eng zusammen (Abb.6). Die maximale Freigabe der mikronisierten Substanz nach einer Stunde liegt bei 5,2 %, die der mit der Kugelmühle behandelten Substanz bei 4,2 %, die der handverriebenen Substanz bei 3,2 %. Wie Sandmann bewies, ist das Desoxycholsäure-Addukt bei pH 1,0 stabil. Die Tatsache, dass in diesem Milieu überhaupt eine geringe Freigabe von Salicylsäure erfolgt, ist durch geringe Mengen von Salicylsäure zu erklären, die an der Oberfläche des Addukts anhaften. Durch das Mikronisieren werden diese Mengen nicht eingeschlossener Salicylsäure etwas erhöht. Damit ist der etwas höhere maximale Freigabewert der Salicylsäure von 5,2 % bei pH 1,0 zu erklären.

Durch diese Ergebnisse wird aber auch bewiesen, dass die Stabilität des Addukts durch die Verfahren der mechanischen Zerkleinerung nicht gelitten haben sollte. Andernfalls wäre eine wesentlich grössere Lösungsgeschwindigkeit der Salicylsäure zu beobachten.

Bei pH 4,5 ist bereits eine stärkere Differenzierung der Löslichkeitskurven zu erkennen. Die maximalen Löslichkeitswerte nach einer Stunde betragen 8,0 , 13,4 und 17,0 %. Auch ist der Anstieg der Kurven mit steigender Oberfläche steiler. Die Kurve der mikronisierten Substanz liegt hier im Zeitbereich bis 5 Minuten unter der Kurve der Substanz II, bedingt durch die grössere Oberflächenspannung.

Bei pH 7,5 erreichen die Lösungsmaxima nach einer Stunde Werte von 46,7 , 55,0 und 69,5 %. Die Differenz im Anstieg der drei Kurven ist signifikant. Es wird in

einem in-vivo Versuch zu Untersuchen sein, inwieweit dieses raschere Lösungsvermögen der mikronisierten Substanz zu einer Erhöhung der Physiologischen Verfügbarkeit führt.

Am deutlichsten ist das Ergebnis des "Dissolution test" bei pH 8,5. Die maximalen Werte der in vitro Freisetzung von 37,5 % , 62,5 % und 75,0 % zeigen deutlich, dass durch Vergrössern der Oberfläche der Einschlussverbindung in vitro eine Erhöhung der innerhalb einer Stunde gelösten Menge um etwa 100 % zu erreichen ist.

Die Lösungsgeschwindigkeit der mikronisierten Substanz liesse sich noch erhöhen, wenn die durch die Mikronisierung hervorgerufene statische Aufladung beispielsweise durch Zugabe eines oberflächenaktiven Stoffes reduziert oder beseitigt würde. Die statische Aufladung bewirkt ein leichtes Agglomerieren der mikronisierten Partikel, so dass beim Einstreuen in die Prüflösung ein sofortiger inniger Kontakt mit der Lösung nicht zustande kommt. Besonders stark tritt dieser Effekt bei pH 1,0 auf, da das Addukt in diesem Milieu praktisch nicht löslich ist und so ein Benetzen der Teilchen durch Anlösen der Oberfläche nicht möglich ist. Dadurch erklärt sich das langsamere Ansteigen der Lösungskurve I bei pH 1,0 , die erst im Bereich nach 5 Minuten die Kurve II schneidet.

Aus diesem Grunde wurde ein wurde ein weiterer "Dissolution test" durchgeführt, bei dem die Freigabe der Salicylsäure aus dem mikronisierten Addukt sowohl ohne als auch unter Zusatz von 0,01 % Tween 80 ^R zur

Pufferlösung geprüft wurde. Es wurde ebenfalls in den pH-Bereichen 1,0 / 4,5 / 7,5 und 8,5 gearbeitet.

In allen Fällen zeigte sich nach einer Stunde eine Erhöhung der Freisetzungsgeschwindigkeit. Im sauren Bereich (pH 1,0 und pH 4,5) lag eine Erhöhung von 5,2 % (ohne Tween) auf 13,1 %, bzw. von 17 % auf 24,6 % vor (Abb. 10 und 11). Dies wird in erster Linie auf eine Solubilisierung von besonders fein dispergierten Teilchen des Adduktes zurückgeführt.

Im alkalischen Bereich (pH 7,5 und 8,5) ist nach einer Stunde eine Erhöhung der Freisetzung von 71,5 % (ohne Tween) auf 75,0 %, bzw. von 76,5 % (ohne Tween) auf 85,6 % zu beobachten (Abb. 12 und 13).

Aus den Versuchen in Gegenwart eines Netzmittels liegt unter Umständen die Folgerung nahe, dass die Magensaft-resistenz der mikronisierten Substanz bei pH-Werten unter 4,5 nicht mehr vollständig vorhanden ist. Dieser Schluss erscheint mir nicht berechtigt. Es ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass durch den Tensid-Zusatz völlig intakte Addukt-Teilchen, sofern sie eine gewisse Grössenordnung unterschritten haben, mizellar solubilisiert werden. Da es sich hierbei noch nicht um molekulardisperse Partikel handelt, sollte kaum eine Dissoziation in die Einzelbestandteile, d.h. Desoxycholsäure und Salicylsäure eintreten. Dies ist wichtig; denn erst in diesem Augenblick würde keine Magensaftresistenz mehr vorliegen. Andererseits ist zu erwarten, dass bei der durchgeführten Probenentnahme zur quantitativen Salicylsäurebestimmung derartig solubilisierte intakte feindisperse Addukt-Teilchen - wenigstens sofern sie eine bestimmte Teilchengrösse unterschritten haben - mit erfasst werden.

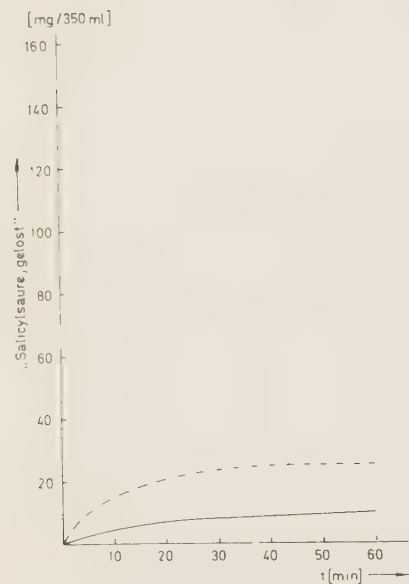


Abb. 10: pH 1,0

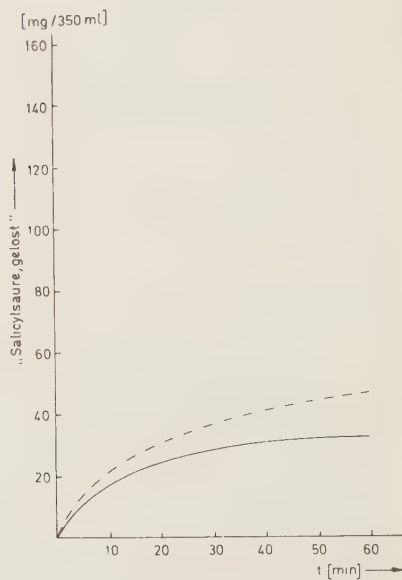


Abb. 11: pH 4,5

Abb. 10 und 11: "Dissolution test" mikronisierte Salicylsäure-Choleinsäure, spez. Oberfl. $6,46 \text{ m}^2/\text{g}$

— ohne Zusatz von Tween 80^R
 - - - mit Zusatz von 0,01 % Tween 80^R

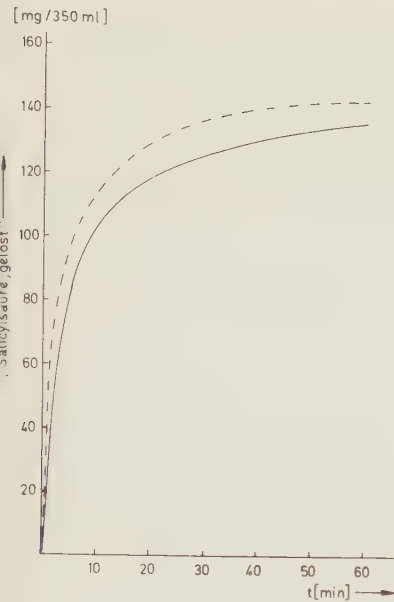


Abb. 12: pH 7,5

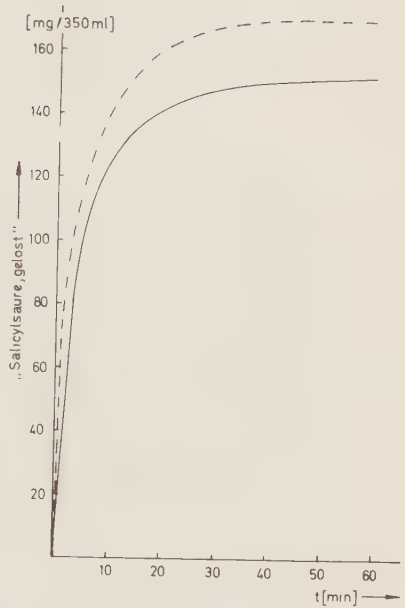


Abb. 13: pH 8,5

Abb. 12 und 13: "Dissolution test" mikronisierte Salicylsäure-Choleinsäure, spez. Oberfl. $6,46 \text{ m}^2/\text{g}$

—— ohne Zusatz von Tween 80^R
----- mit Zusatz von 0,01 % Tween 80^R

Um die Unterschiede der Addukte mit den verschiedenen spezifischen Oberflächen bezüglich der in vitro Freigabe noch einmal unter den kontinuierlichen pH-Bedingungen, wie sie auf eine Arzneiform bei einer Magen-Darm-Passage einwirken, zu untersuchen, wurde als weitere in vitro Methode der "Half-Change" Test nach Münzel (41) herangezogen (Abb. 14).

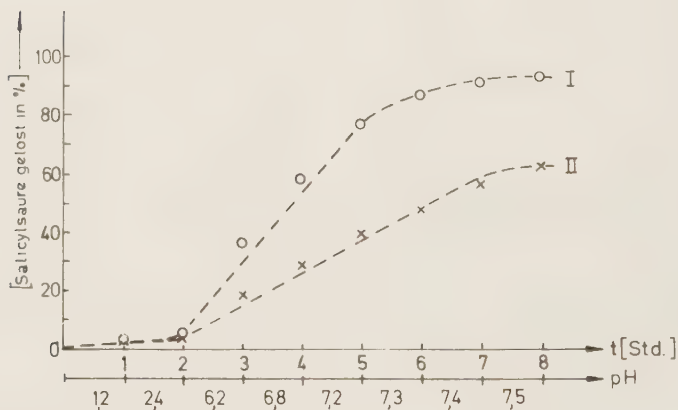


Abb. 14: Salicylsäurefreigabe aus der Choleinsäure nach der " Half-Change " Methode bei 37°

-+---+---+ 750 mg Addukt I, spez. Oberfl. 0,84 m²/g
 -o---o---o 750 mg Addukt III, spez. Oberfl. 6,46 m²/g

Diese Methode erlaubt ein Simulieren der durchschnittlichen pH-Verhältnisse im Magen-Darm-Kanal in Zeitabhängigkeit ohne Berücksichtigung weiterer physiologischer Faktoren.

Dabei wird nach jeder Stunde die Hälfte des ursprünglich eingesetzten Magensaftes durch künstlichen Darmsaft ersetzt und damit der pH-Wert der gesamten Flüssigkeit von etwa pH 1,2 in der ersten Stunde immer mehr in Richtung zum pH-Wert des reinen Darmsaftes bis etwa pH 7,5 bei einer Beobachtungszeit von 8 Stunden verschoben.

Wie aus Abb. 14 zu ersehen ist, beginnt die Wirkstoff-freigabe bei beiden Addukten erst beim Uebergang vom Sauren ins Alkalische nach etwa 2 Stunden, was in vivo mit dem Uebertritt vom Magen in den Darm gleichzusetzen ist. Nach dieser Zeit, d.h. im Neutralen bis schwach Alkalischen erfolgt dann eine deutlich schnellere Freigabe aus dem mikronisierten Addukt, wobei bei beiden Substanzen ein in etwa linearer Anstieg zu beobachten ist, bis ein gewisses Lösungsmaximum erreicht ist.

Es ist also möglich, durch Mikronisierung der Einschluss-verbindung die Freisetzungsgeschwindigkeit der eingeschlossenen Gastkomponente in vitro heraufzusetzen. Nun muss überprüft werden, ob mit diesem in vitro Ergebnis eine Erhöhung der Absorptionsgeschwindigkeit und der Gesamtaborption, d.h. der Physiologischen Verfügbarkeit verbunden ist.

1.2. Exkretionsuntersuchungen am Menschen nach peroraler Applikation

Die in vitro gefundenen Ergebnisse über das Lösungsverhalten des Adduktes in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche sollten nun in vivo überprüft werden.

Um festzustellen, ob die Korngrösse der Einschlussverbindung einen Einfluss auf die Resorptionsgeschwindigkeit und die Gesamtresorption, d.h. die Physiologische Verfügbarkeit hat, wurden 5 Probanden jeweils 2mg Addukt pro kg Körpergeweicht peroral verabreicht.

In einer ersten Versuchsreihe wurde Addukt I mit der spezifischen Oberfläche $0,84 \text{ m}^2/\text{g}$ eingenommen, nach einer Woche wurde in einer zweiten Versuchsreihe Addukt III mit der spezifischen Oberfläche $6,46 \text{ m}^2/\text{g}$ appliziert, wobei nach dem System des "cross-over" jeweil 3 Probanden mit der Versuchsreihe I und 2 Probanden mit der Versuchsreihe III begannen.

Ueber 48 Stunden wurde Harn gesammelt, die Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn erfolgte nach Levy (42). Mit dieser Methode werden die freie Salicylsäure, die Salicylursäure und die Glukuronide der Salicylsäure erfasst. Die Ergebnisse der einzelnen Probanden sind in Abb. 15 bis 19 aufgeführt.

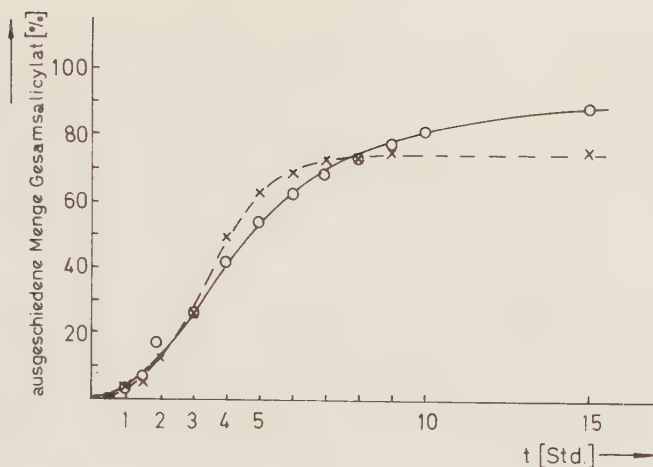


Abb. 15: Proband 1

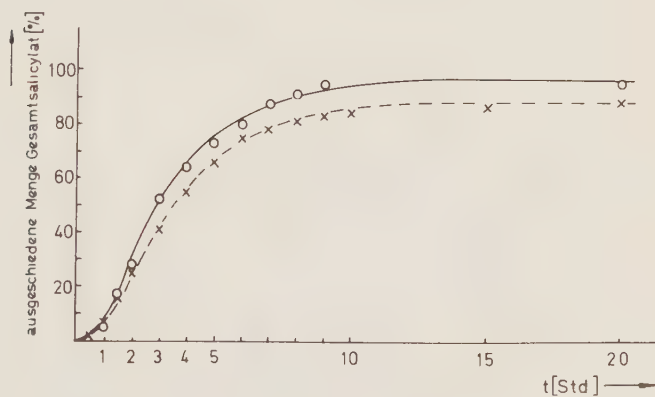


Abb. 16: Proband 2

Abb. 15 - 19: Ausgeschiedene Menge Gesamtsalicylat
bei 5 Versuchspersonen nach oraler Applikation
von 2 mg Addukt pro kg Körpergewicht.

----- Addukt I, spez. Oberfl. 0,84 m²/g
— Addukt II, spez. Oberfl. 1,6,46 m²/g

Abb. 17:
Proband 3

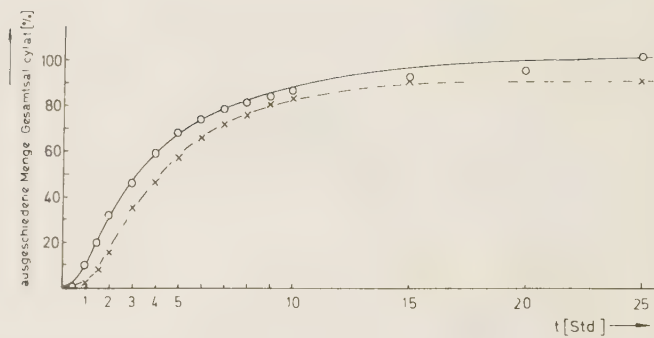


Abb. 18:
Proband 4

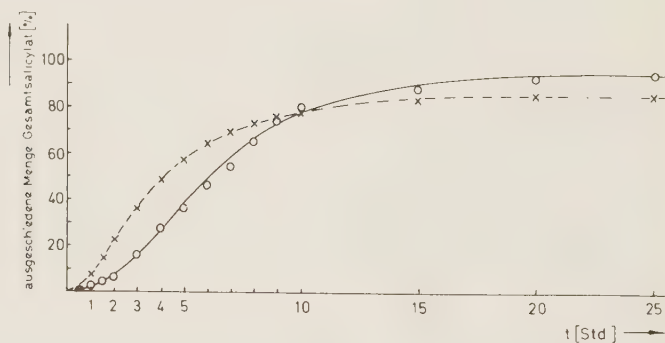
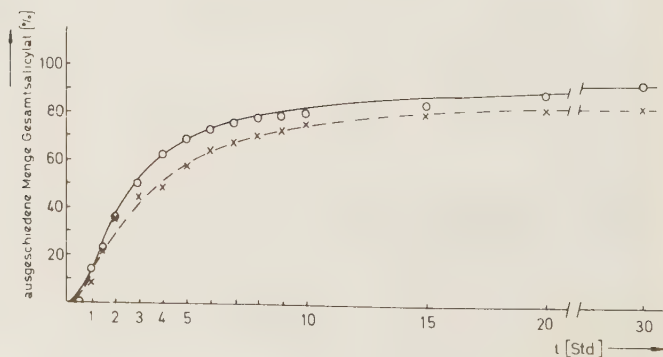


Abb. 19:
Proband 5



Bei drei der Probanden zeigte sich bei der mikronisierten Substanz eine geringfügig schnellere Ausscheidung, bei zwei der Probanden wird die makrokristalline Substanz zunächst schneller ausgeschieden, im Bereich 8 bis 10 Stunden schneiden sich dann die Kurven, die Eliminationsgeschwindigkeit der mikronisierten Substanz überwiegt geringfügig.

Hieraus ist zu folgern, dass die Verringerung der Korngrösse des Addukts die Resorptionsgeschwindigkeit nicht zwangsläufig erhöht. Einwandfrei erhöht sich durch die Mikronisierung die Resorptionsrate der Substanz aus dem Addukt heraus, d.h. die Physiologische Verfügbarkeit ist angestiegen. Bei den vorliegenden Versuchen erfolgte eine durchschnittliche Erhöhung bei den 5 Probanden von 84,65 % auf 94,65 % der verabreichten Salicylsäuremenge (Abb. 20).

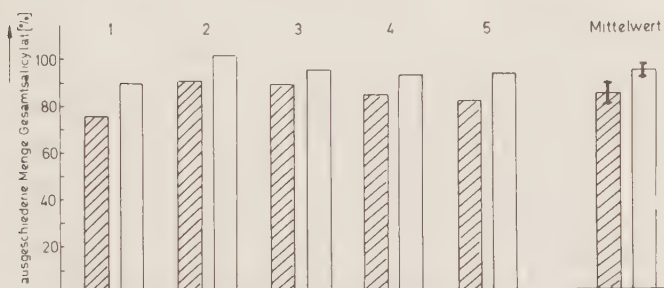


Abb. 20: Maximale Ausscheidung von Gesamtsalicylat im Harn nach oraler Gabe von Salicylsäure-Choleinsäure verschiedener spezifischer Oberfläche $p < 0,01$
 Probe I (0,84 m²/g) Probe II (6,46 m²/g)

Hiermit entspricht die Physiologische Verfügbarkeit der Salicylsäure nach Verabreichung des mikronisierten Adduktes in etwa dem von Sandmann (6) gefundenen Wert von 93,2 % nach peroraler Verabreichung einer Natriumsalicylatlösung.

Die einleitend erwähnte zweite Möglichkeit einer verringerten Physiologischen Verfügbarkeit durch Ausscheidung unveränderten Addukts infolge Erscheinungen einer Diarrhoe bei höherer Dosierung wurde bei den vorliegenden Untersuchungen dadurch ausgeschlossen, dass eine Begrenzung der Dosierung auf 2 mg/kg Körpergewicht vorgenommen wurde. Bei keinem der Probanden trat eine merkliche Veränderung des Stuhles auf.

Es scheint demnach zweckmässig, bei der pharmazeutischen Verwendung von Desoxycholsäure-Einschlussverbindungen zur maximalen Ausnutzung der eingesetzten Substanzmengen eine Mikronisierung des Adduktes vorzunehmen.

2. Anwendung des "Buccal-Tests" nach Beckett und Triggs auf Salicylsäure-Choleinsäure

2.1. Zusammenhänge zwischen Resorption und Exkretion und neueren in vitro Methoden

Die Art der Resorption von Arzneistoffen ist eine der wesentlichsten Faktoren für die Physiologische Verfügbarkeit von Pharmaka im Körper. Von der Resorptionsgeschwindigkeit und der Menge des pro Zeiteinheit resorbierten Arzneistoffes hängt es in erster Linie ab, ob der gewünschte Blutspiegelwert erreicht wird und wie schnell dies erfolgt. Die Parameter der Elimination sollen hierbei nicht berücksichtigt werden.

Eine ganze Reihe von in vitro Modellen wurde entwickelt, um gewisse Aussagen über das Resorptionsverhalten verschiedener Substanzen machen zu können (49, 50). So bestimmte in neuerer Zeit Stricker (51) die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante von einigen Arzneistoffen in vitro mit Hilfe eines Resorptionsmodells (52) und stellte bei den getesteten Substanzen gute Übereinstimmung mit den in vivo gefundenen Werten fest. Wesentliche Bestandteile des Modells sind künstliche Lipoidbarrieren, die sich in der Durchlässigkeit gegenüber "passiv" transportierten Arzneistoffen (53) ähnlich verhalten, wie die natürliche Magen- bzw. Darmwand. Die Resorbierbarkeit eines Arzneistoffes in einem bestimmten Abschnitt des Gastrointestinaltraktes (z.B. Magen, Duodenum, Ileum etc.) lässt sich durch eine konzentrationsunabhängige Grösse, die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante ausdrücken, die in einer bestimmten Relation mit der im Resorptionsmodell ermittelten Diffusionsgeschwindigkeitskonstante steht.

Folglich lässt sich die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante aus der Diffusionsgeschwindigkeitskonstanten berechnen.

Andere Autoren stellten Beziehungen zwischen der Resorptionskonstanten und dem Verteilungskoeffizienten einer Substanz in einem hydrophilen/lipophilen System fest (54, 55) oder setzten Resorption bzw. Diffusion mit dem pka-Wert in Relation (56). Alle diese beschriebenen Verfahren sind reine in vitro Methoden und berücksichtigen im allgemeinen nur einen oder einige wenige der die Resorption beeinflussenden Faktoren. Unter den komplizierten Vorgängen der Arzneistoffresorption spielt vor allem jedoch die Lipoidlöslichkeit des Arzneistoffes eine sehr wichtige Rolle.

2.2. Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit für die Arzneistoffresorption

Bereits um die Jahrhundertwende stellten Meyer (57) und Overton (58) beim Arbeiten mit narkotisch wirksamen Substanzen fest, dass die Wirksamkeit dieser Stoffe mit deren Lipoidlöslichkeit ansteigt. Ebenso wurde bereits frühzeitig erkannt, dass die Lipoidlöslichkeit eine grosse Bedeutung für die Resorption und Verteilung von Substanzen im Organismus besitzt (59). Die Bedeutung dieser Lipoidlöslichkeit ist dadurch bedingt, dass sich die verabreichten Arzneistoffe im Körper nicht wie in einer homogenen Flüssigkeit frei verbreiten können. Dem steht die Unterteilung des Flüssigkeitsraumes im Organismus durch Membranen entgegen. Diese Membranen sind durch einen mehr oder weniger stark ausgeprägten lipophilen Charakter

gekennzeichnet und lassen daher bevorzugt Arzneistoffe mit lipoiden Eigenschaften passieren. Von besonderer Bedeutung bei einer peroralen Applikation ist die Resorption durch die Magen- und Darmwände. Für den Stofftransport sind in erster Linie drei Mechanismen zu diskutieren, nämlich der aktive Transport, der passive Transport und die Pinocytose. Arzneistoffe werden nach unserer heutigen Kenntnis in der überwiegenden Mehrzahl passiv transportiert.

Die Bedingungen für den passiven Transport eines Stoffes durch biologische Membranen sind desto besser, desto lipophiler der betreffende Stoff ist. Das hat eine besondere Bedeutung für eine grosse Anzahl von Arzneistoffen, die in Form schwacher Säuren oder Basen vorliegen. Für eine schwache Säure sind die Voraussetzungen für eine Resorption besonders günstig im Magen, da hier die Säure wesentlich in der nicht dissoziierten Form vorliegt, während für schwache Basen günstigere Voraussetzungen im Dünndarm bestehen. Ein wesentlicher Teil der biopharmazeutischen Untersuchungen befasst sich mit dem Resorptionsvermögen von Arzneistoffen in Abhängigkeit von den physikalischen Eigenschaften und den pk-Werten.

2.3. "Buccal-Test" nach Beckett und Triggs

Aufbauend auf die Berichte von Gibaldi und Kanig im Jahre 1965 (60) und die grundlegenden Versuche von Walton und Lacy (61) über die Resorption von Arzneistoffen durch die Mucosa der Mundhöhle und die Experimente von Overton (62) und Schanker (63) über die pH-Abhängigkeit der Arzneistoffresorption, entwickelten Beckett und Triggs (64) die Methode

des "Buccal-Tests" als ein Modell für den passiven Transport von Arzneimitteln durch eine Lipoidmembran. Dieses Resorptionsmodell kommt den Resorptionsvorgängen im Darmkanal sehr nahe. Die Mucosa der Darmwand wird dabei durch die Mundschleimhaut substituiert, während der wechselnde pH-Wert des Magen- Darmkanals durch unterschiedliche pH-Werte der in die Mundhöhle eingebrachten Pufferlösungen simuliert wird. Der Arzneistoff wird in den verschiedenen Pufferlösungen gelöst, letztere bringt man in den Buccalraum ein und bewegt die Lösung durch Kaubewegungen während eines bestimmten Zeitabschnittes. Anschliessend wird die wieder ausgespuckte Pufferlösung quantitativ auf den nicht resorbierten Arzneistoffgehalt untersucht. Die so zu ermittelnde Menge an resorbiertem Arzneistoff in Abhängigkeit vom pH der Pufferlösung erlaubt Rückschlüsse auf das Resorptionsverhalten der Substanz im Verdauungstrakt. So ist z.B. zu ersehen, bei welchen pH-Werten in vivo maximale Resorption in Abhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten erfolgt und wie somit die Arzneiform zu konzipieren ist, oder welchen Einfluss der Urin-pH auf die tubuläre Rückresorption besitzt (65). Lien und Mitarbeiter (66) gelang es wiederum, mathematische Zusammenhänge zwischen Buccaltest und dem Verteilungskoeffizienten verschiedener Substanzen in 1-Octanol/Wasser zu finden, indem sie im Gegensatz zu früheren Arbeiten den log des Verteilungskoeffizienten einsetzten.

Dass jedoch auch Vergleiche zwischen übereinstimmender Absorption im Magen-Darm-Kanal und in der Mundhöhle mit einer gewissen Vorsicht gezogen werden müssen, zeigte kürzlich Taraszka (67) am Clindamycin. Dieses Antibioticum wird aus dem menschlichen

Magen-Darm-Kanal gut resorbiert; es zeigte jedoch so gut wie keine buccale Absorption. Der Verfasser führt dies möglicherweise auf Unterschiede in der Oberfläche, im Transportmechanismus und/oder pH-Unterschiede zwischen oraler Mucosa und den Magen-Darm-Wänden zurück. Es sollte auch eine Mitbeteiligung entgegengesetzt geladener Ionen und die damit mögliche Ausbildung von besser resorbierbaren Ionenpaaren als möglicher Resorptionsmechanismus mit in Betracht gezogen werden.

Diese Methode des "Buccal-Tests" schien mir trotzdem geeignet, das Resorptionsverhalten von Salicylsäure in Gegenwart von Desoxycholsäure in vivo zu untersuchen. Allerdings kam für diese Untersuchungen nur ein pH-Bereich von pH 7 bis pH 9 in Frage, da einerseits die Desoxycholsäure nur oberhalb pH 7 in grösserer Menge löslich ist, andererseits im Organismus maximal pH 9 erreicht wird. Die Salicylsäure liegt bei diesem pH zwar weitgehend dissoziiert vor und wäre im Sinne des passiven Transportes nur schlecht resorbierbar. Doch sollte gerade die Wirkung der anwesenden Desoxycholsäure auf das Resorptionsverhalten der Salicylsäure einen Einfluss haben. Derartige Untersuchungen bereiten im menschlichen Darm, bedingt durch die Gegenwart der körpereigenen Gallensauren Schwierigkeiten. Nach Borgström (68) hat die Desoxycholsäure neben anderen Gallensäuren einen erheblichen Anteil an der Resorption von Nahrungsbestandteilen im Darmkanal.

Zur Untersuchung wurden Pufferlösungen mit pH 7,5 und 8,5 verwendet. Es wurde mit reiner Salicylsäure und mit gelöstem Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt gearbeitet:

Lösung a: 2,5 mg Salicylsäure in 25 ml Puffer
gelöst.

Lösung b: 10 mg Salicylsäure-Desoxycholsäure-
Addukt in 25 ml Puffer gelöst, ent-
sprechend 2,5 mg Salicylsäure und
7,5 mg Desoxycholsäure

An dem Versuch nahmen 6 Probanden im Alter von ca. 25 Jahren teil. Die erhaltenen Resorptionswerte sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	pH 7,5	pH 8,5
Lösung a:	12,4 %	4,8 %
Lösung b:	8,0 %	8,8 %

Tab. 1: Durchschnittliche Resorption von Salicylsäure bei 6 Probanden nach buccaler Applikation

Die unter a angegebenen Werte zeigen, dass die Salicylsäure alleine nur in geringem Masse resorbiert wird. Dies war auch nicht anders zu erwarten, denn bei pH 7,5 und 8,5 liegt praktisch vollständige Dissoziation der Salicylsäure vor. Gerade unter diesem Gesichtspunkt ist die gefundene Resorption von 12,4 % bei pH 7,5 innerhalb 5 Minuten noch überraschend hoch. Die bei pH 8,5 gefundene verringerte Resorption sollte durch die noch verstärkte Dissoziation zu erklären sein.

Das schliesst ein ähnliches Verhalten der Buccal- und der Magen-Darm-Membranen hinsichtlich der Salicylsäure-Absorption nicht aus. Es ist ja immer noch nicht mit Sicherheit geklärt, warum die Salicylsäure im Dünndarm, wo sie praktisch ebenfalls vollständig ionisiert vorliegt, trotzdem in erheblichem Umfang resorbiert wird.

Jedoch ist die aus den Lösungen a und b durchschnittlich resorbierte Menge Salicylsäure mit 4,8 % bis 12,4 % meiner Ansicht nach zu gering, um hieraus richtige Schlüsse hinsichtlich einer Resorptionsverbesserung oder -Verschlechterung durch den Einsatz des gelösten Adduktes zu ziehen, zumal bei diesen niedrigen Werten der Prozentsatz an nur scheinbar resorbierter, aber in Wirklichkeit nur an der Oberfläche der Schleimhaut und der Zähne absorbierter Substanz relativ hoch, d.h. der Fehler relativ gross sein dürfte. Auch die Verlängerung der Verweildauer der Pufferlösung im Buccalraum von 5 auf 10 Minuten brachte hier keine Veränderung der Ergebnisse.

Daher kann gesagt werden, dass mit dem "Buccal Test" nach Beckett und Triggs keine Aussage über eine verbesserte Resorption der Salicylsäure in Anwesenheit der Desoxycholsäure zu machen ist. Die Unterschiede in der Resorption der Salicylsäure aus einer Lösung von Salicylsäure alleine und dem gelösten Salicylsäure-Addukt sind zu gering. Alle weitergehenden Deutungen der einzelnen Resorptionsszahlen erscheinen mir rein spekulativ und daher nicht zweckmässig.

3. Das Verhalten von Salicylsäure-Choleinsäure in verschiedenen Salbengrundlagen

Nach der Feststellung, dass sich Desoxycholsäure-Einschlussverbindungen bei peroraler Applikation einerseits zur Verwendung als pharmazeutische Retardform eignen und andererseits eine geeignete Methode darstellen, besonders empfindliche Arzneistoffe vor Umweltseinflüssen wie Licht, Luftsauerstoff, Feuchtigkeit usw. zu schützen, sollte die Frage geklärt werden, inwieweit sich derartige Addukte zur epikutanen Applikation verwenden lassen.

Das Heranziehen von Desoxycholsäure-Addukten zur Herstellung von Salben und Cremes wäre mit Sicherheit eine wünschenswerte Bereicherung der technologischen Möglichkeiten, Arzneistoffe zu verarbeiten, die sich aus Stabilitätsgründen normalerweise nicht auf der Basis von Salben und Cremes verwenden lassen. So kämen z.B. Arzneistoffe in Frage, die entweder bei der Lagerung als Salbenpräparate von Luftsauerstoff oder anderen Umweltseinflüssen angegriffen werden oder mit den verwendeten Salbengrundlagen zumindest bei längerer Lagerung inkompatibel sind. Je nach Problemstellung würden an eine solche Salbe verschiedene Ansprüche gestellt werden müssen.

3.1. Liberation des Wirkstoffes aus dem Addukt und Resorption des Wirkstoffes

Die Verarbeitung von Einschlussverbindungen in Salben mit dem Ziel, den eingeschlossenen Arzneistoff zu stabilisieren, setzt voraus, dass eine Liberation des Wirkstoffes aus der Wirtskomponente in der Salbe nicht oder nur in sehr kleinem Umfang stattfindet. Daraus wäre die Bedingung abzuleiten, dass nach dem Auftragen auf die Haut entweder eine Resorption der gesamten Einschlussverbindung erfolgt oder aber durch den Kontakt mit der Haut, beziehungsweise durch die damit verbundenen Faktoren (Einmassieren, Occlusivverband, Wärme, pH-Änderung) eine Freisetzung der Gastkomponente aus dem Addukt auf der Haut erfolgt, welche dann resorbiert werden kann. Sowohl die Aufnahme des gesamten Addukt-Moleküls als auch eine Begünstigung der Resorption durch die Anwesenheit der Desoxycholsäure ist nicht auszuschliessen.

3.2. In vitro Untersuchungen über die Wirkstofffreisetzung in Salbengrundlagen

Zur Untersuchung der in vitro Abgabe des Wirkstoffes aus einer Salbengrundlage - unabhängig von den verschiedenen Resorptionsfaktoren der Haut - werden in der Literatur zahlreiche Versuchsmodelle beschrieben. So kann z.B. mittels der Agar-Diffusionsmethode von der Anfärbung des aus der Grundlage in den Agar diffundierten Wirkstoffes je nach Farbintensität auf die Menge freigesetzter Substanz geschlossen werden (69). Diese Methode ist zwar zu Vorversuchen

geeignet, lässt sich aber quantitativ schlecht durchführen. Anfangs von mir durchgeführte Versuche mit Salicylsäuresalbe auf mit Eisen(III)-chlorid getränktem Agar nach der Methode von Wand und Ramsay (70,71,72) brachten nicht die gewünschten Ergebnisse, da beim Einsatz der Einschlussverbindung eine relativ lange Versuchszeit resultiert. In diesem Zeitraum sind im Agarblock keine klaren Trennlinien zwischen gefärbtem und ungefärbtem Teil mehr zu beobachten, so dass keine konkrete Relation aufgestellt werden kann.

Eine günstigere Methode schien mir der Modellversuch nach Billups und Patel (73) zu sein, der eine Diffusionskammer mit aufgesetzter Dialysemembran benutzt. Ich variierte die Versuchsanordnung und erhielt eine Apparatur, die es erlaubt, eine relativ dünne Schicht Salbe auf einer Dialysemembran gleichmässig zu verteilen. Diese Apparatur wird in ein Gefäss mit auf 37° erwärmter 0,1 N HCl eingebracht und die Konzentration freigesetzten Wirkstoffes in der Salzsäure in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

Es ist allgemein bekannt, dass die einzelnen Arzneistoffe aus den verschiedenen Salbengrundlagen unterschiedlich stark freigesetzt werden, jedoch gibt es verschiedene Auffassungen darüber, inwieweit das vom Typ der Grundstoffe abhängt, d.h. für sie spezifisch ist. Im allgemeinen geben die mit Wasser abwaschbaren Salbengrundlagen den Wirkstoff besser ab, als die hydrophoben Salben (74,75,76). Büchi und Mitarbeiter (77) empfehlen sogar einen Wasserzusatz als Emulsion zu ausgesprochenen Suspensionssalben, wodurch eine Wirkungssteigerung erreicht wird. Bereits Monocarp (78) hatte feststellen können, dass Salicylsäure aus einer F/W - Grundlage

besser absorbiert wird, als aus einer W/F-Grundlage. Polano und Mitarbeiter (79) gelangten in klinischen Untersuchungen zu dem gleichen Ergebnis.

Es war nun sowohl in Hinsicht auf die in vitro Freisetzung als auch auf die in vivo Resorption zu untersuchen, wie das Verhalten der Salicylsäure-Desoxycholsäure-Einschlussverbindung in verschiedenen Salbengrundlagen zu charakterisieren ist. Hierzu verwendete ich 4 unterschiedliche Grundlagen, und zwar

- I. "Wasserhaltige hydrophile Salbe" DAB 7
als F/W-Emulsion (Wassergehalt 70 %, Emulgatoranteil ca. 10 %)
- II. "Eucerin Beiersdorf^R, wasserhaltig" als
W/F-Emulsion (Wassergehalt 50 %, Emulgatoranteil ca. 3 %)
- III. Vaseline DAB 7
- IV. Polyäthylenglykolsalbe DAB 7

Als Vergleichssubstanz diene reine Salicylsäure mit der jeweiligen Grundlage.

Für die Freigabe der Gastkomponente aus der Einschlussverbindung dürfte vor allem die Löslichkeit des Adduktes in der Grundlage eine Rolle spielen. Die dadurch bedingte Freisetzung der Salicylsäure aus dem Addukt vor der

Applikation sollte mit Hilfe des Diffusionstests an der Dialysemembran beobachtet werden.

Einen wichtigen Faktor hinsichtlich der Wirkstoffabgabe aus Salben stellt natürlich auch der Verteilungsgrad der Substanz dar. So wurde von verschiedenen Autoren (77,80,81) festgestellt, dass hinsichtlich der Freisetzung und Resorption von Chloramphenicol aus Salben die am feinsten verteilte Form die günstigste sei. Sie wird im allgemeinen durch Lösen des Wirkstoffes in Wasser und anschliessender Emulgierung der Lösung in der Grundlage erzielt. Soweit es sich um wasserunlösliche Substanzen bzw. um Suspensionssalben handelt, wird eine möglichst weitgehende Zerkleinerung der Partikel empfohlen. Tawashi und Speiser (82) konnten zeigen, dass durch das Vergrössern der Oberfläche einer Substanz eine Verbesserung der Wirkstofffreigabe aus Salbengrundlagen zu erzielen ist. Aus diesem Grunde wurden auch bei den vorliegenden Untersuchungen eine mit der Luftstrahlmühle mikronisierte Einschlussverbindung eingesetzt. Es wurden mit jeder der Salbengrundlagen 3 Salben angefertigt und zwar

- I. reine Salicylsäure in der Grundlage
- II. das mikronisierte Addukt in der Grundlage und
- III. Salicylsäure mit Desoxycholsäure im physikalischen Gemisch.

3.2.1. Wirkstofffreisetzung aus Salicylsäure-Salben

Bei der reinen Salicylsalbe wurde die Salicylsäure aus der F/W- Emulsionssalbe etwas besser freigesetzt als aus der W/F-Grundlage; die beste Freigabe erfolgte aus der Polyäthylenklykolgrundlage, die schlechteste aus dem Vaseline. Eingesetzt wurden 5 g Salbe mit 250 mg Salicylsäure, davon wurden innerhalb 24 Stunden 43,3 % aus der F/W- und 39,5 % aus der W/F-Emulsionssalbe freigegeben (Abb. 21 und 22). Die Liberation aus dem Vaseline war vergleichsweise gering, sie betrug 16,6 % nach 24 Stunden (Abb. 23). Dagegen wurde bei der Polyäthylenglykolsalbe eine steil ansteigende Freisetzungskurve beobachtet, die nach 24 Stunden einen Wert von 57,5 % erreicht (Abb. 24).

3.2.2. Wirkstofffreisetzung aus Salicylsäure-Choleinsäure-Salben

Eingesetzt wurden 5 g Salbe mit 1 g mikronisiertem Addukt, entsprechend 250 mg Salicylsäure. In allen Fällen waren die freigesetzten Mengen sehr gering. Die Werte nach 24 Stunden betrugen 5,5 % bei der F/W-Emulsionssalbe und 5,0 % bei der W/F-Emulsionssalbe. Die Abgabe des Wirkstoffes schien bei beiden Emulsionssalben ziemlich gleichmässig zu erfolgen. Bei der Polyäthylenglykolgrundlage war anfangs ein etwas schnellerer Anstieg zu beobachten, der sich bereits nach etwa 10 Minuten einem asymptotischen Wert von 4,5 % näherte. Aus dem Vaseline erfolgte praktisch keine Freisetzung (1,25 % nach 24 Stunden).

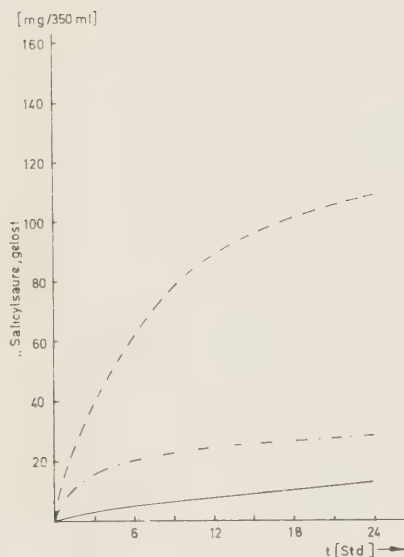


Abb. 21

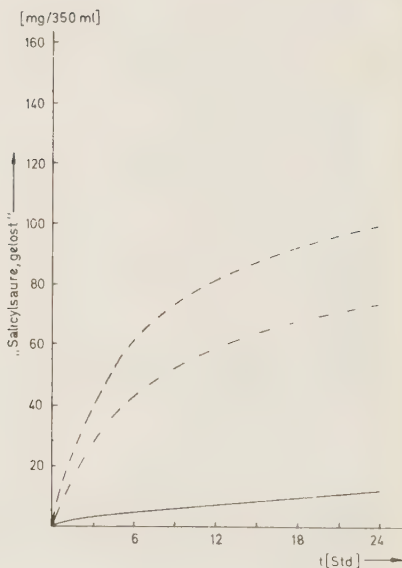


Abb. 22

Abb. 21: Freisetzung von Salicylsäure aus "Hydrophiler Salbe" DAB 7 in der Diffusionszelle

Abb. 22: Freisetzung von Salicylsäure aus "Wasserhaltigem Eucerin" Beiersdorf in der Diffusionszelle

- nach Einsatz von 250 mg Salicylsäure
- .-.- nach Einsatz von 250 mg Salicylsäure + 750 mg Desoxycholsäure im physikalischen Gemisch
- nach Einsatz von 1 g mikronisiertem Addukt entsprechend 250 mg Salicylsäure

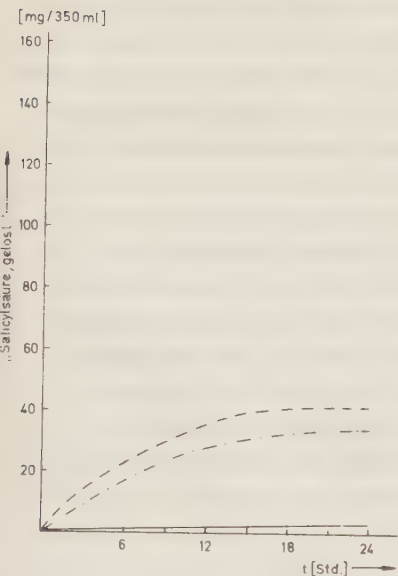


Abb. 23

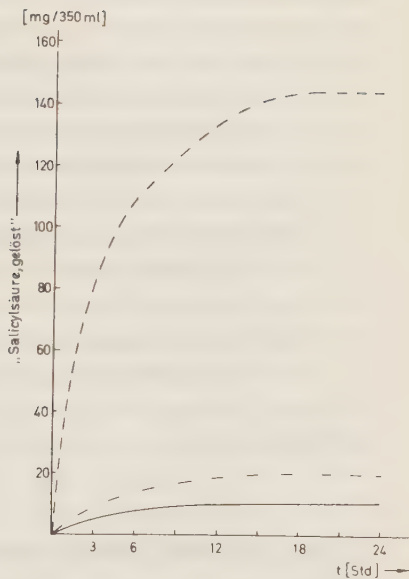


Abb. 24

Abb. 23: Freisetzung von Salicylsäure aus Vaseline DAB 7 in der Diffusionszelle

Abb. 24: Freisetzung von Salicylsäure aus Polyäthylenglykolsalbe DAB 7 in der Diffusionszelle

- nach Einsatz von 250 mg Salicylsäure
- .-. nach Einsatz von 250 mg Salicylsäure + 750 mg Desoxycholsäure im physikalischen Gemisch
- nach Einsatz von 1 g mikronisiertem Addukt entsprechend 250 mg Salicylsäure

Daraus lässt sich ableiten, dass zumindest ein spontanes Auflösen der Addukte in den untersuchten Salbengrundlagen nicht stattfindet. Ein kleiner Prozentsatz von Arzneistoff wird ja immer vom Addukt an der Oberfläche adsorbiert und wäre dann in der Lage durch die Salbe zu diffundieren. Allerdings ist bei der vorliegenden Versuchsanordnung ausser der Freisetzungsgeschwindigkeit des Gastmoleküls aus dem Addukt auch noch die Freisetzungsrates infolge Diffusion des Wirkstoffes aus der Salbengrundlage im Ergebnis integriert. Vor einer Verarbeitung des Adduktes zu einem galenischen Präparat sind somit noch Lagerungs- und Stabilitätsuntersuchungen hinsichtlich der Freigabe der Gastkomponente aus dem Addukt bei längerer Einwirkung der Grundlage nötig. So wurden anschliessend von mir Untersuchungen über das Verhalten des Adduktes in der Salbengrundlage bei einer 8-wöchigen Lagerung durchgeführt.

3.2.3. Wirkstofffreisetzung aus Salben mit Salicylsäure und Desoxycholsäure als physikalischem Gemisch

Um den Einfluss der Desoxycholsäure auf die Liberation nicht eingeschlossener Salicylsäure aus der Grundlage beurteilen zu können, wurde eine Versuchsreihe erstellt, bei der ein mengenmässig der Einschlussverbindung entsprechendes einfaches physikalisches Gemisch in die jeweilige Grundlage inkorporiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass offensichtlich die Gegenwart der Desoxycholsäure einen hemmenden Einfluss auf das Diffusionsvermögen des verwendeten Arzneistoffes ausübt. Beim Einsatz von gleicher Menge Salicylsäure wie bei den anderen Versuchen resultierte hierbei eine Liberation

von nur 11,1 % aus der F/W-Grundlage gegenüber 43,3 % beim Versuch mit Salicylsäure alleine. Bei Vaseline als Grundlage verläuft die Freisetzungskurve des Gemisches etwa parallel unterhalb der Salicylsäurekurve und erreicht einen Maximalwert von 14 % Freisetzung nach 24 Stunden. Ganz deutlich ist der Unterschied in der Freisetzung zwischen reiner Salicylsäure und dem Stoffgemisch bei der Polyäthylenglykosalbe. Hier liegt die Kurve des Gemisches nur um wenig über der des Addukts und erreicht nach 24 Stunden einen Wert von 8,3 %. Möglicherweise sind hierfür gewisse Adsorptionskräfte zwischen der Salicylsäure und der Desoxycholsäure verantwortlich. Der naheliegenden Vermutung, dass durch die Konsistenzhöhung der Salbe, begründet durch das Einarbeiten von 15 % Desoxycholsäure ungünstigere Diffusionsbedingungen geschaffen seien, steht das Versuchsergebnis bei der F/W-Emulsionssalbe entgegen. Hier zeigte sich nämlich ein wesentlich günstigeres Ergebnis; die Liberation lag bei 29,3 % gegenüber 39,5 % im Versuch mit Salicylsäure alleine. Auch bei den späteren in vivo Versuchen bestand dieser Unterschied, obwohl hier die Salben in sehr dünner Schicht aufgetragen und überdies eingerieben wurden.

Zusammenfassend ergeben diese in vitro Versuche, dass die Liberation und damit vermutlich auch die Resorption der verwendeten Modellsubstanzen durch die Anwesenheit von Desoxycholsäure - sei es im Addukt oder im Gemisch - keinesfalls begünstigt, sondern eher gehemmt wird.

3.2.4. Freigabe der Gastkomponente aus dem Addukt nach Lagerung in verschiedenen Salbengrundlagen

Um eine Aussage über die Stabilität der Choleinsäure bei der Lagerung in verschiedenen Salbengrundlagen machen zu können, wurden jeweils 20 % mikronisiertes Addukt in den verschiedenen Salbengrundlagen verarbeitet.

Zunächst wurde versucht, durch mikroskopische Betrachtung in Zeitabhängigkeit eventuelle Veränderungen wie z.B. Auflösungserscheinungen, Verfärbung oder Kristallwachstum zu registrieren. Dies erwies sich vor allem bei den Emulsionsgrundlagen als schwer durchführbar, da das mikroskopische Bild durch die Anwesenheit der 2 Phasen Wasser und Fett schlecht zu beurteilen war. Mit dieser Methode war bei allen vier Grundlagen eine Veränderung im Adduktkristall nicht feststellbar. So benutzte ich eine andere Methode, bei der die eventuell freigesetzte Salicylsäure aus der Salbe extrahiert und anschliessend durch Titration bestimmt wird. In je 3 g Salbe wurde der Gehalt an freier Salicylsäure

- a. nach der Herstellung
- b. nach 24-stündiger Lagerung bei 37° und
- c. nach 8-wöchiger Lagerung bei Zimmertemperatur

festgestellt.

Die ermittelten Werte sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigte sich eine gute Stabilität des Adduktes nach Einarbeitung sowohl in Vaseline als auch in wasserhaltigem

Eucerin. Der nach 8 Wochen ermittelte Gehalt der beiden Salben an freier Salicylsäure von 0,46 % bzw. 0,64 % darf wohl vernachlässigt werden, ebenso der Wert von 0,92 % bei der Vaseline-Salbe nach der Herstellung. Diese Werte sind kein Anhaltspunkt für ein Lösen der Einschlussverbindung in der Salbengrundlage.

Grundlage	Nach Her- stellung	Nach 24 Stunden	Nach 8 Wochen
Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB 7	5,25	7,55	17,20
Eucerin ^R Beiersdorf, wasserhaltig	----	----	0,64
Polyäthylenglykol- salbe DAB 7	15,60	18,40	25,00
Vaseline DAB 7	0,90	----	0,40

Tab. 2: Freisetzung von Salicylsäure in % aus dem Addukt bei Lagerung in verschiedenen Salbengrundlagen

Dagegen findet in der Polyäthylenglykolgrundlage ein solcher Vorgang eindeutig statt. Bereits nach der Herstellung werden beim Ausschütteln der in 0,1 N Salzsäure gelösten Salbe 15,6 % freie Salicylsäure festgestellt. Nach 24 Stunden Lagerung der auf einer Glasplatte ausgestrichenen Salbe bei 37° konnten 18,4 %, nach 8-wöchiger Lagerung bei Zimmertemperatur 25,0 % freie Salicylsäure festgestellt werden. Ebenso wurden bei der Titration der freien Salicylsäure in der wasserhaltigen hydrophilen Salbe 5,2 % nach der Herstellung, 7,5 % nach 24 Stunden bei 37° und 17,2 % nach 8-wöchiger Lagerung gefunden.

Es findet demnach also ein Lösungsvorgang der Choleinsäure in der Polyäthylenglykosalbe DAB 7 und der wasserhaltigen hydrophilen Salbe DAB 7 statt, der diese Grundlagen zur Herstellung eines galenischen Präparates ungeeignet erscheinen lässt. Vaseline und wasserhaltiges Eucerin dagegen scheinen innerhalb von 8 Wochen keinen Stabilitätsverlust der Choleinsäure zu bewirken.

Eine Erklärung dieser Lösungsvorgänge lässt sich durch die generelle Löslichkeit der Choleinsäuren in vielen aliphatischen Alkoholen finden. Vermutlich löst sich die Choleinsäure ebenfalls in Polyäthylenglykol, auch wenn dieser in salbenartiger Konsistenz vorliegt. Entsprechende Versuche zeigten, dass sich die Desoxycholsäure und auch die Salicylsäure-Choleinsäure ziemlich rasch in flüssigem Polyäthylenglykol 300 lösen, das ja ein Bestandteil der DAB-Salbe ist. Auch in der wasserhaltigen hydrophilen Salbe ist in Cetyl-Stearyl-Alkohol ein Alkohol enthalten. Nachprüfungen ergaben, dass dieser ebenfalls Choleinsäure zu lösen vermag.

3.3. Resorptionsbeeinflussende Faktoren bei epikutaner Applikation

Die bei den in vitro Untersuchungen mit den beiden Emulsionsgrundlagen erhaltenen Ergebnisse sollten jetzt in vivo überprüft werden.

Bei der perkutanen Absorption spielen nach Gstirner und Elsner (83) folgende Faktoren eine Rolle:

1. Die Penetration und der Absorptionsmechanismus der Haut.
2. Die Hauttemperatur
3. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Arzneistoffe.
4. Die Beschaffenheit der Vehikel bzw. der Salbengrundlage und der Zusatz von Tensiden.
5. Die Applikationsmethode und die Dauer der Applikation.

Der Vorgang der Absorption ist physikalisch-chemisch gesehen ein sehr komplexer Vorgang, in dem Diffusion, Löslichkeit, elektrolytische Anziehung und Abstossung, Kapillarkräfte, chemische Zwischenreaktionen und biologische Prozesse mitwirken (83). Die genaueren Vorgänge hierbei sind bis heute nicht hinreichend bekannt.

Der Absorptionsmechanismus untersteht der Beeinflussung durch die Beschaffenheit der Haut, dem Hauttyp. Fette Haut, mit einem hohen Gehalt an Fett und Talg bietet andere Resorptionsvoraussetzungen als eine trockene Haut mit geringer Talgproduktion. Die Stoffaufnahme kann entweder

durch transfollikuläre oder durch transepidermale Wege stattfinden. Hierbei spielt der Verteilungskoeffizient zwischen Grundlage und lipophiler Epidermis eine Rolle, wobei wiederum eine Beziehung zu dem oben genannten Fettgehalt der Haut besteht. Eine gute Löslichkeit des Pharmakons in der Grundlage kann sich folglich negativ auf das Eindringen in die tieferen Hautschichten auswirken.

Somit sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften einer gut zu resorbierenden Substanz durch eine gewisse Lipophilie einerseits (Lösen im Hautfett) und eine gewisse Hydrophilie andererseits (Lösen in der Gewebeflüssigkeit) zu charakterisieren. Die verschiedenen Hautschichten, vor allem das Stratum Corneum wirken als Diffusionsmembranen. Sie bedingen den Widerstand, der einer Substanz beim Eindringen in die Haut und beim Uebertritt in die Papillarkörper und in das Blutgefäßsystem entgegensteht.

Die Diffusion besteht aus einem Ausgleich von Konzentrationsunterschieden durch die Molekularbewegung, deren Intensität wiederum temperaturabhängig ist. Hieraus ist leicht der Einfluss der Hauttemperatur auf die Diffusionsgeschwindigkeit abzuleiten. Gleichzeitig bewirkt eine erhöhte Hauttemperatur die Herabsetzung der Viskosität des Hautfettes, was ein schnelleres Lösen lipophiler Substanzen zur Folge hat. Durch die parallel auftretende Erweiterung der Hautkapillaren und Blutgefäße wird ein beschleunigter Abtransport der absorbierten Substanzen ermöglicht.

Die Beschaffenheit der Salbengrundlage ist von grosser Bedeutung. Zunächst hat die Grundlage die Aufgabe, den eingesetzten Wirkstoff in möglichst innigen Kontakt mit der Haut zu bringen. Hierbei können Zusätze von Tensiden zur Grundlage eine optimierende Wirkung haben. Es ist aber wichtig, dass die Salbengrundlage den Wirkstoff leicht wieder freisetzen kann, damit dieser dann aus der Salbengrundlage, die nicht absorbiert wird, weiter in die Haut eindringen kann.

Auch der Applikationsmechanismus ist von Bedeutung. Einmassieren ermöglicht das Einpressen der Salbe bis tief in die Haarbälge und Drüsenausgänge (85) verbunden mit dem Vermischen der Salbe mit dem Hautfett und einer eventuellen Temperaturerhöhung der Haut. So konnte Kalbhen (86) bei Versuchen mit Strontiumchloridlösung zeigen, dass sich durch das Einmassieren in die Haut . eine Steigerung der Absorption bis um das 3-fache erzielt werden kann.

3.4. In vivo Absorption und Elimination aus

Emulsionsgrundlagen

Für die in vivo Versuche wurden die beiden Emulsionsgrundlagen 10 Minuten in die Haut einmassiert und dann mit einem Plastikverband abgedeckt. Es sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Werden bei epikutaner Applikation von Salicylsäure-Einschlüssen der Desoxycholsäure genügend Anteile der Gastkomponente absorbiert und sind diese Addukte somit in Salbengrundlagen pharmazeutisch zur Anwendung zu bringen?
2. Besteht ein Unterschied in der Absorption der eingeschlossenen Salicylsäure aus der F/W- und der W/F-Grundlage?
3. Inwieweit besteht Uebereinstimmung zwischen den in vitro und den in vivo Ergebnissen hinsichtlich der Absorption der Salicylsäure aus dem Addukt?
4. Bestätigt sich die aus den in vitro Versuchen resultierende hemmende Wirkung der Desoxycholsäure auf die Absorption der Salicylsäure bei epikutaner Anwendung eines Gemisches Salicylsäure-Desoxycholsäure in vivo?

Es wurden 2 Gruppen von je 3 Probanden jeweils 3 Salbenpräparate appliziert:

Gruppe I:

- a. 5 g wasserhaltiges Eucerin mit 5 % Salicylsäure
- b. 5 g wasserhaltiges Eucerin mit 20 % mikronisiertem Addukt, entsprechend 5 % Salicylsäure
- c. 5 g wasserhaltiges Eucerin mit 5 % Salicylsäure + 15 % Desoxycholsäure im physikalischen Gemisch

Gruppe II:

- a. 5 g wasserhaltige hydrophile Salbe DAB 7 mit 5 % Salicylsäure
- b. 5 g wasserhaltige hydrophile Salbe DAB 7 mit 20 % mikronisiertem Addukt, entsprechend 5 % Salicylsäure
- c. 5 g wasserhaltige hydrophile Salbe DAB 7 mit 5 % Salicylsäure + 15 % Desoxycholsäure im physikalischen Gemisch

Auf die Ermittlung von Durchschnittswerten wurde verzichtet, da hierdurch häufig die tatsächlichen Relationen verfälscht werden, es sei denn es handelt sich um eine sehr grosse Anzahl von Probanden. Aus diesem Grunde werden die erzielten Kurven der einzelnen Probanden diskutiert. Die Kurven zeigen Eliminationswerte, die aber infolge der raschen Ausscheidung der Salicylsäure als Mass für die erfolgte Absorption betrachtet werden können.

3.4.1. In vivo Absorption aus Salicylsäure-Salben

Die Absorption des Wirkstoffes aus der reinen Salicylsäure-salbe als F/W-Emulsion beträgt bei allen 3 Probanden etwa 20 % der eingesetzten Menge innerhalb von 6 Stunden (Tab. 3) und ist nach 24 Stunden bei einem Wert von 70 bis 80 % abgeschlossen (Abb. 24-26).

		Ö/W			W/O		
Proband		1	2	3	4	5	6
	Elimination in % nach						
Salicylsäure	6 Std.	18,10	230	20,90	18,56	32,22	39,50
	24 Std.	73,80	707	79,30	50,13	58,80	50,25
Addukt	6 Std.	2,36	2,35	2,09	0,40	1,87	3,70
	24 Std.	19,15	26,70	15,85	5,79	8,70	22,90
Gemisch	6 Std.	5,15	8,15	8,17	10,77	12,98	21,08
	24 Std.	27,30	26,30	20,60	31,10	43,60	38,25

Tab. 3: Gesamtsalicylatausscheidung bei 6 Probanden nach epikutaner Applikation

Die Absorption aus der W/F-Emulsionsgrundlage erfolgte in den ersten 6 Stunden bei 2 Probanden etwas rascher (ca. 35 %), bei einem Probanden liegt sie wie bei der F/W-Emulsion bei ca. 20 %. Nach 24 Stunden nähert sich der Wert dem Endwert von 50 bis 60 % bei allen 3 Probanden (Abb. 27-29). Damit ergibt sich hier eine anfangs etwas raschere, aber insgesamt geringere Absorption der Salicylsäure aus der W/F-Emulsionsgrundlage.

Abb. 24:
Proband 1.

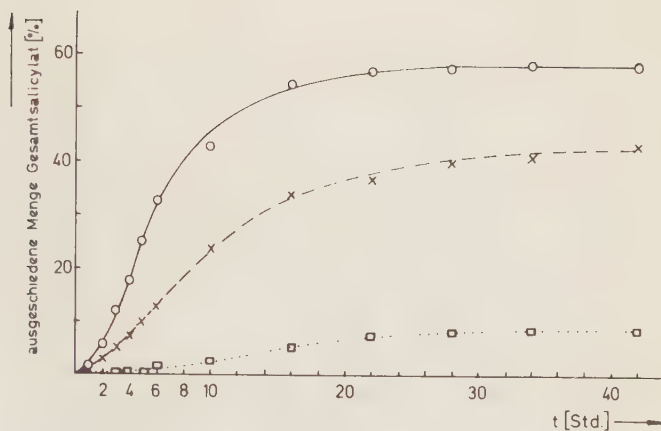


Abb. 25:
Proband 2

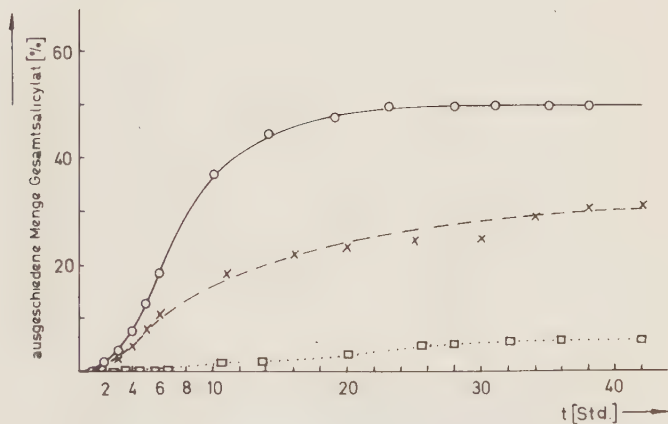


Abb. 24, 25 und 26: Ausgeschiedene Menge Gesamtsalicylat nach epikutaner Applikation von 5 g W/F-Emulsionssalbe enthaltend

- 250 mg Salicylsäure
- 250 mg Salicylsäure + 750 mg Desoxycholsäure
im physikalischen Gemisch
- ... 1 g mikronisiertes Addukt, entsprechend
250 mg Salicylsäure

Abb. 26:
Proband 3

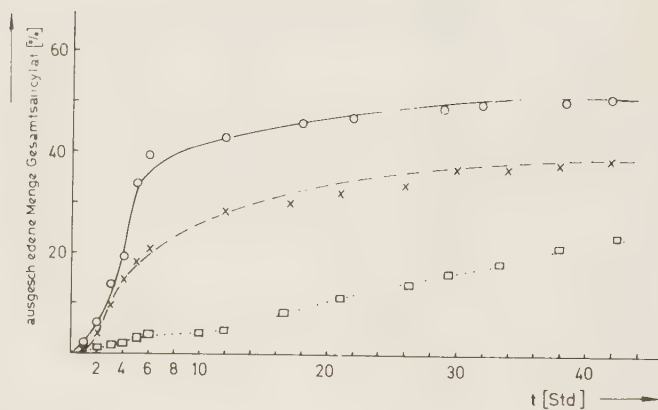


Abb. 27:
Proband 4

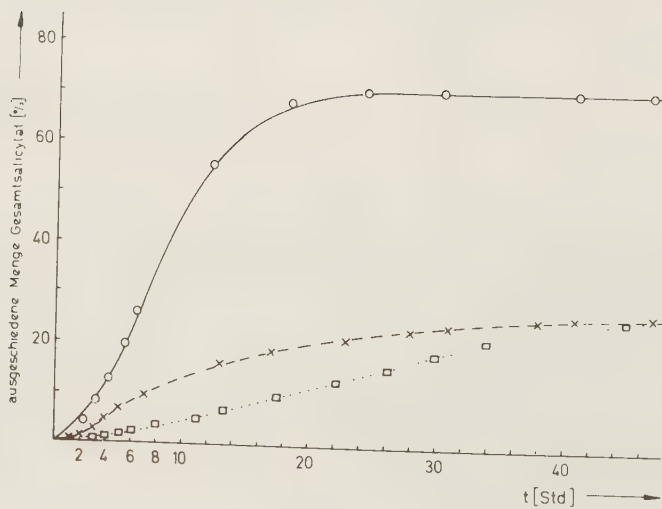


Abb. 28:
Proband 5

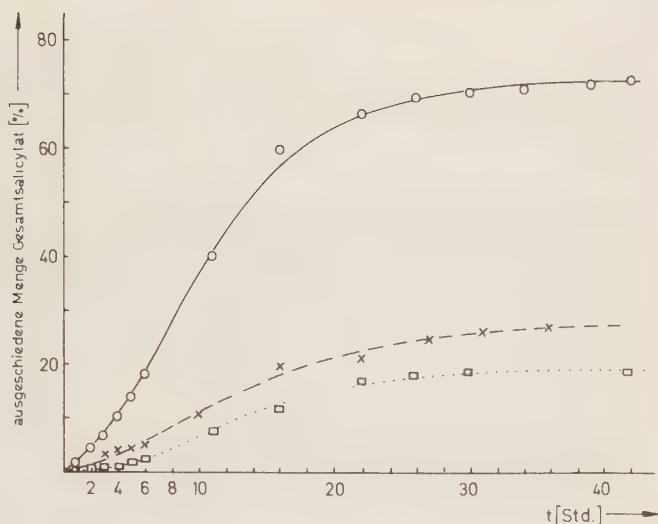


Abb. 29:
Proband 6

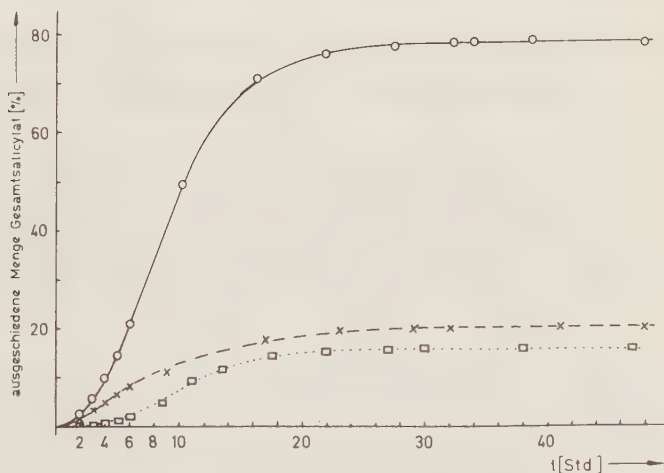


Abb. 27, 28 und 29: Ausgeschiedene Menge Gesamtsalicylat nach epikutaner Applikation von 5 g F/W-Emulsionssalbe enthaltend

- 250 mg Salicylsäure
- - - 250 mg Salicylsäure + 750 mg Desoxycholsäure im physikalischen Gemisch
- ... 1 g mikronisiertes Addukt, entsprechend 250 mg Salicylsäure

3.4.2. In vivo Absorption aus Salicylsäure-Choleinsäure-Salben

Die Eliminationskurve von Salicylsäure bei Verwendung des Addukts zeigt in beiden Fällen eine deutlich geringere Absorption an; so sind aus der F/W-Emulsionsgrundlage nach 6 Stunden erst etwas mehr als 2 % eliminiert, bei 2 Probanden geht der 24-Stunden-Wert gegen den Endwert von 15 bis 19 %; bei einem Probanden ist die Elimination nach 46 Stunden noch nicht abgeschlossen. Bei der W/F-Emulsion ist bei 2 der 3 Probanden eine noch geringere Freigabe als bei der F/W-Emulsion zu beobachten.

3.4.3. In vivo Absorption aus Salben mit Salicylsäure und Desoxycholsäure als physikalischem Gemisch

Stark unterschiedlich lagen nun die Werte beim Gemisch Salicylsäure-Desoxycholsäure. Bei der F/W-Emulsion ist bei allen 3 Probanden vor allem am Anfang eine etwas verstärkte Salicylat-Ausscheidung zu beobachten. Der Unterschied zu der Eliminationskurve nach Anwendung des Adduktes ist jedoch in allen Fällen nicht allzu gross. Es scheint also der in vitro gefundene hemmende Einfluss der Desoxycholsäure auf die Absorption der Salicylsäure auch unter physiologischen Bedingungen zu bestehen, auch wenn der Arzneistoff nicht als Addukt vorliegt. Bei der W/F-Emulsion liegen die Werte des Gemisches etwa in der Mitte zwischen denen der reinen Salicylsäure und denen des Addukts. Hier ist der hemmende Einfluss der Desoxycholsäure auf die Salicylsäure-Absorption nicht so stark.

Damit lassen sich folgende Aussagen machen:

1. Der Anteil absorbiierter Substanz aus dem Addukt ist bei beiden Grundlagen mit 5,8 bis 26,7 % zu niedrig, um eine Anwendung der Einschlussverbindung in Emulsions-Salben-Präparaten mit dem Ziel einer Resorption günstig erscheinen zu lassen, es sei denn, es handelt sich um ein Addukt mit sehr niedrig zu dosierender Gastkomponente.
2. Es besteht ein Unterschied in der Absorption aus der W/F- und der F/W-Grundlage. Die reine Salicylsäure und die Salicylsäure aus dem Addukt werden aus der W/F-Grundlage schlechter absorbiert.
3. Zwischen den in vitro und in vivo Ergebnissen hinsichtlich der Absorption der Salicylsäure aus dem Addukt besteht Uebereinstimmung. In beiden Fällen erfolgt bei Vorliegen des Addukts die schlechteste Absorption bzw. Freigabe; die Kurven des physikalischen Gemisches in vivo und in vitro liegen zwischen denen des Adduktes und denen der freien Salicylsäure.
4. Die Salicylsäure aus dem Gemisch wird aus der W/F-Grundlage eindeutig besser resorbiert, wenn auch die Werte hierfür deutlich unter den Werten für reine Salicylsäure liegen. Demnach scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass die fein verteilte Desoxycholsäure je nach Beschaffenheit des Vehikels einen unterschiedlich hemmenden Einfluss auf die Absorption der Salicylsäure ausübt.

4. Resorption der Gastkomponente der Salicylsäure- Choleinsäure nach rektaler Applikation

Neben der Untersuchung der peroralen und der epikutanen Anwendung sollten nun auch noch einige Versuche über Möglichkeiten einer rektalen Applikation der Salicylsäure-Choleinsäure durchgeführt werden.

In zahlreichen Arbeiten wurde versucht, sowohl die Freisetzung des Arzneistoffes aus den verschiedenen Suppositoriengrundlagen als auch das Resorptionsverhalten aus der Arzneiform in vivo zu beschreiben. Mehrere Modellversuche wurden erstellt, um die Freisetzung des Pharmakons aus der Grundlage zu beobachten (87). Nach Henning (88) lassen sich von allen Modellversuchen nur die mit der Methode nach Neuenschwander (89) erzielten Versuchsergebnisse mit den Befunden bei Resorptionsuntersuchungen am Menschen vergleichen. Neuenschwander, sowie auch später Weiss und Sciarrone (90) ermittelten den Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen Suppositoriengrundlage und einer wässrigen Phase, die durch eine Diffusionszelle mit aufgespannter Dialysemembran getrennt sind. Für jeden Arzneistoff kann eine bestimmte Grundlage zu optimaler Resorption führen. Die Angaben in der Literatur zeigen, dass allgemeingültige Aussagen darüber, welche Grundlagen und welcher Zusatz von Hilfsstoffen den Resorptionseffekt steigern oder verlangsamen, kaum zu machen sind (91).

Bei den vorliegenden Versuchen mit Stadimol^R eine Suppositoriengrundlage gewählt, die ein bekannt gutes Freisetzungsvermögen gegenüber Salicylsäure besitzt und ein gutes Schmelzverhalten zeigt. Auf in vitro Liberationsuntersuchungen wurde verzichtet.

Die eleganteste Methode zur Bestimmung der Arzneistoff-resorption stellt die Verwendung radioaktiver Indikatoren dar, hierbei bleibt das Untersuchungsspektrum jedoch weitestgehend auf Tierversuche beschränkt. Häufig wird die Bestimmung eines Arzneimittels im Blut und Harn nach rektaler Applikation herangezogen (92). Unter herkömmlichen Voraussetzungen lassen sich die im Harn ausgeschiedenen Mengen mit den Blutspiegelwerten korrelieren (93). Die Gesamtresorption eines rektal applizierten Arzneistoffes kann in diesen Fällen an dessen Eliminierung im Harn verfolgt werden.

Eine rektale Verwendung von Desoxycholsäure-Einschlussverbindungen wäre unter den gleichen Gesichtspunkten, wie bei der perkutanen Anwendung wünschenswert. Bei den vorliegenden Untersuchungen sollte deshalb anhand der Salicylsäure-Desoxycholsäure festgestellt werden, ob aus einer solchen Arzneiform genügend Arzneistoff resorbiert wird und in welchem Zeitraum dies geschieht.

5 gesunden Versuchspersonen wurden zunächst 5 Suppositorien, enthaltend 100 mg reine Salicylsäure, und in einer zweiten Versuchsreihe den gleichen Probanden 5 Suppositorien, enthaltend je 400 mg mikronisiertes Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt appliziert. Nur 3 der Probanden waren in der Lage, die stark laxierende Wirkung des Adduktes zu überwinden und das

Zäpfchen während 24 Stunden im Darm zu behalten.
2 Probanden schieden die Arzneiform nach kurzer Zeit wieder aus. Sie erhielten nach einiger Zeit Zäpfchen mit der Hälfte der anfangs verwendeten Dosis.

Bei allen 5 Probanden zeigte sich eine deutlich langsamere Resorption aus den Addukt-Suppositorien (Abb. 30 - 34). So war die Hälfte der insgesamt aus den Addukt-Zäpfchen resorbierten Substanz nach einem Zeitraum von 5,5 bis 10 Stunden (siehe Tab. 4) wieder ausgeschieden, während aus den reinen Salicylsäure-Zäpfchen bereits nach 2,5 bis 4 Stunden 50 % der insgesamt ausgeschiedenen Menge eliminiert waren.

Proband	Salicylsäure	Addukt
1	2,5	5,5
2	3,5	8,0
3	4,0	8,0
4	2,5	10,0
5	3,5	8,0

Tab. 4: Anzahl der Stunden, nach der 50 % der von 5 Probanden insgesamt absorbierten Dosis eliminiert waren

Somit ist eine deutliche Verzögerung der Wirkstofffreigabe aus dem Addukt zu bemerken. Erwähnenswert ist, dass die Abgabe gleichmässiger aus dem Addukt heraus zu erfolgen scheint. Die insgesamt absorbierte Menge Salicylsäure aus dem Addukt von 58,5 bis 69,9 % der eingesetzten Verbindung (Tab. 5) sollte sich durch entsprechende technische Vorraussetzungen (z.B. Herstellung eines Emulsionszäpfchens) noch verbessern lassen.

Proband	Salicylsäure	Addukt
1	60,6	58,6
2	69,6	60,1
3	80,6	66,9
4	80,7	69,9
5	79,7	64,3

Tab. 5: Ausscheidung von Gesamtsalicylat in % bei 5 Probanden, 24 Stunden nach rektaler Applikation

Sie liegt bei den von mir gemachten Untersuchungen etwas unterhalb der Salicylsäure-Gesamtresorption von 60,6 bis 80,6 % aus den reinen Salicylsäure-Suppositorien. Vermutlich verbleibt etwas ungelöste Einschlussverbindung im Faecis und wird mit den Resten der Grundmasse wieder ausgeschieden.

Abb. 30:
Proband 1

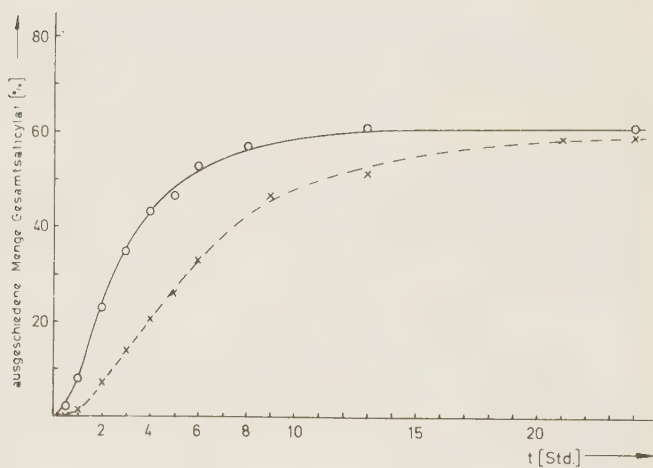


Abb. 31:
Proband 2

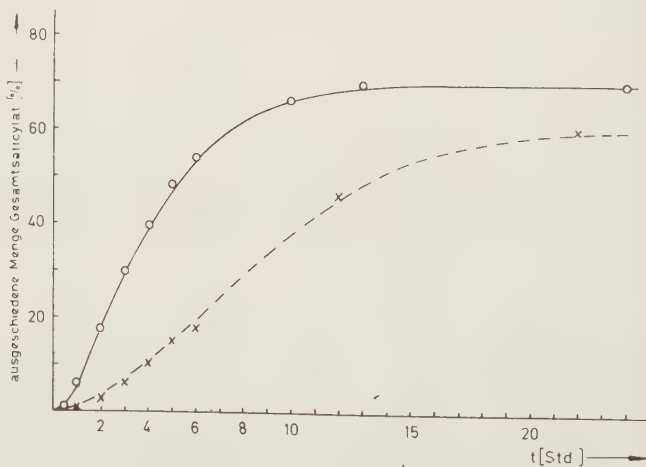


Abb. 30 und 31: Ausgeschiedene Menge Gesamtsalicylat
nach rektaler Applikation von

- 100 mg Salicylsäure
- - - 400 mg mikronisiertem Addukt, entsprechend
100 mg Salicylsäure

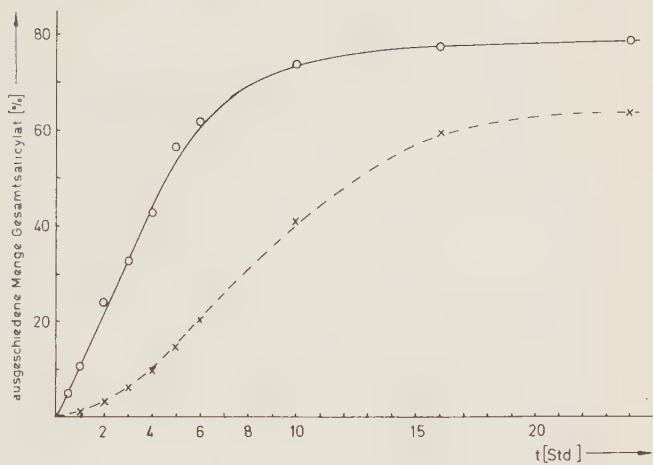


Abb. 32:
Proband 3

Abb. 32: Ausgeschiedene Menge Gesamtsalicylat
nach rektaler Applikation von

- 100 mg Salicylsäure
- - - 400 mg mikronisiertem Addukt, entsprechend
100 mg Salicylsäure

Abb. 33:
Proband 4

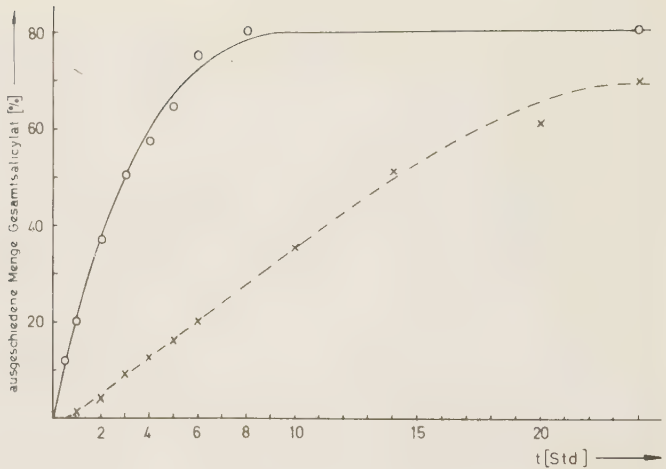


Abb. 34:
Proband 5

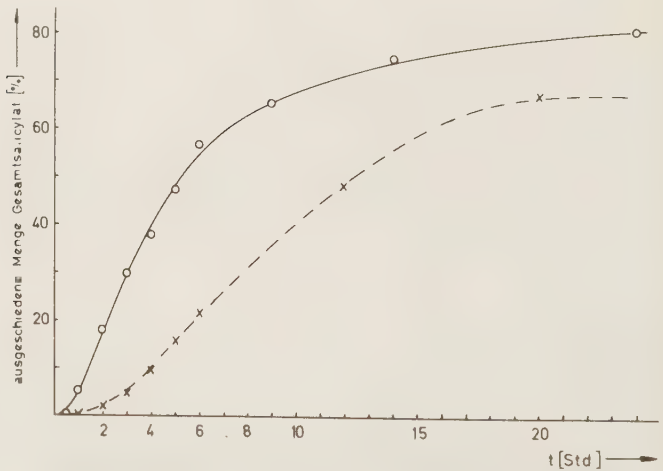


Abb. 33 und 34: Ausgeschiedene Menge Gesamtsalicylat
nach rektaler Applikation von

- 50 mg Salicylsäure
- - - 200 mg mikronisiertem Addukt, entsprechend
50 mg Salicylsäure

Eine grosse Schwierigkeit allerdings bereitet die laxierende Wirkung der Desoxycholsäure. Frömming und Sandmann (6) hatten bei ihren Versuchen nach oraler Applikation des Addukts bei mehreren Probanden eine leichte Diarrhoe festgestellt. Bei rektaler Applikation zeigte sich bereits bei Gaben von 400 mg Addukt eine so starke Laxierung, dass von 5 Probanden 2 Probanden den Versuch mit halber Dosis neu ansetzen mussten. Auch bei Einnahme dieser halbierten Dosis traten leichte Darmkrämpfe und ein Druckgefühl im Unterleib auf.

So müsste die rektale Anwendung von Desoxycholsäure-Einschlüssen auf eine sehr kleine Dosis beschränkt werden, so dass nur sehr stark wirkende und somit ebenfalls gering zu dosierende Gastkomponenten für eine derartige Anwendung in Frage kämen.

5. Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der pharmazeutischen Anwendung von Einschlussverbindungen der Desoxycholsäure befasst, wobei in erster Linie die Physiologische Verfügbarkeit des Gastmoleküls nach Applikation verschiedener galenischer Zubereitungen untersucht wurde. Neben der Behandlung pharmazeutischer Fragen hinsichtlich der Anwendung von Einschlussverbindungen am Menschen sollten diese Untersuchungen einen Beitrag zu dem Problem der Wechselwirkungen zwischen Wirk- und Hilfsstoffen in der gleichen Arzneiform leisten. Als Gastkomponente verwendete ich hierbei die Salicylsäure.

Die Anregung für diese Problemstellung gaben Untersuchungen über die Verwendung solcher Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukte als magensaftresistente Arzneiform, die in unserem Arbeitskreis von Frömming und Sandmann (6) durchgeführt wurden. Hierbei hatten sich Differenzen in der Physiologischen Verfügbarkeit nach oraler Applikation zwischen reiner Salicylsäure und dem Addukt ergeben. So erhob sich die Frage, ob die geringere Physiologische Verfügbarkeit des Adauktes durch unvollständiges Lösen im Darm bedingt ist oder ob die laxierende Wirkung der Desoxycholsäure hierfür verantwortlich ist, indem ein Teil der Verbindung durch vorzeitige Ausscheidung der Resorption entzogen wird.

Anhand von in vitro Versuchen konnte ich zeigen, dass durch Vergrössern der spezifischen Oberfläche der Einschlussverbindung eine Erhöhung der Lösungs-

geschwindigkeit aus dem Addukt heraus innerhalb einer Stunde erreicht werden kann. Bereits nach entsprechender Zerkleinerung der Substanzpartikel mit der Kugelmühle trat dieser Effekt auf, er ist nach Mikronisierung der Substanz in einer Luftstrahlmühle beachtlich. Die teilweise auftretende Agglomerierung der mikronisierten Partikel liess sich durch Zugabe einer oberflächenaktiven Verbindung zum Lösungsmittel weitgehend beheben. Hierdurch wurde eine weitere Verbesserung des Lösungsverhaltens der Einschlussverbindung erzielt.

Im in vivo Versuch am Menschen konnten die in vitro Versuchsergebnisse bestätigt werden, wobei durch relativ niedrige Dosierung ein laxierender Effekt vermieden wurde. Es ergab sich eine Erhöhung der Physiologischen Verfügbarkeit um etwa 10 % durch Einsatz der mikronisierten Verbindung, wodurch kein wesentlicher Unterschied mehr gegenüber der Verabreichung einer Natriumsalicylatlösung vorliegt. Gerade in Anbetracht des Laxierungseffektes der Desoxycholsäure scheint es mir wichtig zu sein, die Physiologische Verfügbarkeit des Addukts durch Vergrössern der spezifischen Oberfläche zu erhöhen, um so die Dosierung niedriger halten zu können.

Bei der Suche nach einer einfach zu handhabenden Untersuchungsmethode für das Resorptionsverhalten der Desoxycholsäure-Addukte prüfte ich die Verwendungsmöglichkeit des "Buccal-Tests" nach Beckett und Triggs. Hierbei zeigte sich, dass diese günstig erscheinende Testmethode keine eindeutigen Aussagen zum vorliegenden Problem erbringt. Die vermutete Resorptionsverbesserung an der Mundschleimhaut durch das in Lösung vorliegende Desoxycholsäure-Addukt konnte nicht bestätigt werden.

Eine weitere wesentliche Frage erschien in der Anwendungsmöglichkeit des Adduktes in Form von Salben-Präparaten. Hierdurch könnte eine Möglichkeit gegeben sein, instabile Arzneistoffe in eine stabile Form zu überführen. Es musste jedoch die Stabilität des Addukts in verschiedenen Salbengrundlagen und die Frage, ob nach der Applikation eine Resorption der Gastkomponente erfolgen kann, abgeklärt werden. Die zunächst durchgeführten in vitro Versuche zeigten eine relativ geringe Freisetzung der Gastkomponente aus dem Addukt innerhalb 24 Stunden bei Einarbeitung in Vaseline, Polyäthylenglykosalbe und je eine W/F- und eine F/W-Emulsionsgrundlage. Stabilitätsuntersuchungen nach 8-wöchiger Lagerung der Salben liessen gute Stabilität des mikronisierten Addukts in Vaseline und in wasserhaltigem Eucerin^R erkennen, während das Addukt in wasserhaltiger hydrophiler Salbe DAB 7 und in Polyäthylenglykosalbe DAB 7 nach 8 Wochen einen Teil der Gastkomponente freigesetzt hatte.

Die mit den beiden Emulsionsgrundlagen durchgeführten in vivo Untersuchungen ergaben eine relativ geringe Exkretion der Salicylsäure nach epikutaner Applikation des mikronisierten Adduktes, was auf eine nur geringe Physiologische Verfügbarkeit hinweist. Diskutabel wäre demnach eine diesbezügliche Anwendung nur bei sehr niedrig zu dosierenden Arzneistoffen, wobei allerdings die Genauigkeit der Dosierung weitere Probleme stellt. Eine Uebereinstimmung zwischen in vitro und in vivo Untersuchungen konnte gefunden werden. Auch scheint sich zu bestätigen, dass die Desoxycholsäure wider Erwarten einen hemmenden Einfluss auf die Absorption der Salicylsäure besitzt, da auch bei Applikation eines physikalischen Gemisches eine Hemmung der Salicylsäure-Resorption erfolgte.

Bei rektaler Anwendung von Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukten stellte sich das Problem stark laxierender Wirkung. Es scheint auch hier eine Verwendung der Addukte nur im Bereich niedriger Dosierung möglich. Die resorbierte Gesamtmenge an Pharmakon war bei rektaler Applikation zufriedenstellend, so dass die Möglichkeit der Stabilisierung empfindlicher Substanzen durch Bildung von Einschlussverbindungen in Betracht käme. Auch konnte eine in etwa gleichmässige Abgabe des Arzneistoffs aus dem im Suppositorium eingearbeiteten Addukt beobachtet werden, jedoch scheint die zur Resorption von 50 % des Wirkstoffes benötigte Zeitspanne von über 10 Stunden eine rektale Anwendung des Addukts in Frage zu stellen.

Zusammenfassend muss hinsichtlich der Einarbeitung von Desoxycholsäure-Einschlussverbindungen in Arzneiformen gesagt werden, dass unter den untersuchten Zubereitungen nur eine Verwendung in peroral zu applizierenden Formen vertretbar ist. Hierbei sind zwei Voraussetzungen zu beachten. Einmal darf die Dosierung des Addukts wegen sonst zu befürchtender laxierender Wirkungen nicht zu hoch gewählt werden; zum anderen muss, um eine weitestgehende Resorption im Darmkanal zu erreichen, ein Addukt mit einer grossen spezifischen Oberfläche verwendet werden. Als kaum vertretbar erscheint die Verwendung in Salben - jedenfalls sofern eine Resorption beabsichtigt ist - und in Suppositorien. Die Resorptionsrate aus den untersuchten Salbengrundlagen ist sehr gering, während nach rektaler Applikation mit einer stark laxierenden Wirkung zu rechnen ist.

III. Experimenteller Teil

1. Darstellung der Salicylsäure-Choleinsäure

In Anlehnung an die Arbeitsweise von Wieland und Sorge (45) werden

28,0 g Desoxycholsäure in 100 ml Methanol
heiss gelöst und
8,0 g Salicylsäure hinzugegeben.

Beim langsamen Abkühlen scheiden sich weisse Kristalle ab, die mit gekühltem Methanol 70 % gewaschen werden
Weitere Reinigung der Substanz erfolgt durch Spülen mit 0,1 N Salzsäure.

Ausbeute: 65 %

Schmelzpunkt: 196°

Gehalt: 25 bis 26 %, spektralphotometrisch gemessen
in Aethanol bei 305 nm

Molverhältnis Desoxycholsäure : Salicylsäure = 1:1

2. Zerkleinerungsverfahren

Die Zerkleinerung des Addukts erfolgte:

- a. In einem aufgerauten Porzellanmörser durch 5-minütiges Verreiben.
- b. In einer Labor-Fliehkraft-Kugelmühle (Modell Pulverisette 6, Fa.Fritsch) durch 10-minütiges Mahlen.
- c. In einer Luftstrahlmühle (Jet-Mill) +)

+) Die Zerkleinerung erfolgte in der galenischen Abteilung der Firma Schering AG, ich danke Herrn Dr.P.Fuchs für seine freundliche Unterstützung.

3. Bestimmung der spezifischen Oberfläche

Die spezifische Oberfläche der Substanzen wurde durch das Verfahren der Tieftemperatur-Stickstoff-Adsorption (BET-Methode) bestimmt. Es wurde mit einem Areameter, Bauart Ströhlein, gearbeitet. Die Vorbehandlung der Proben zwecks Gasadsorption erfolgte durch 2-stündiges Spülen mit Stickstoff bei Raumtemperatur.

4. "Dissolution Test" nach Levy (40)

Die Versuchsanordnung besteht aus einem 600 ml-Becherglas mit der jeweiligen Untersuchungslösung von 350 ml. Es wurde mit einem dreiflügligen Propellerrührer gearbeitet, Rührgeschwindigkeit 60 U/Min., Eintauchtiefe 50 %, Temperatur 37°. Zum Zeitpunkt Null wurden die abgewogenen Substanzen in die Untersuchungslösung gegeben. Nach 1, 3, 5, 10, 30 und 60 Minuten wurden mit einer Sterilfilterspritze jeweils 5 bis 7 ml abgenommen und dann genau pipetiert. Als Filter wurden einfache Papierfilter angewendet. Die entnommenen Proben wurden dann mit 0,1 N Salzsäure auf 50,0 ml aufgefüllt. Zur Entfernung ausgefallener Desoxycholsäure wurde durch Papier filtriert. Die Salicylsäure wurde spektralphotometrisch bei 305 nm gemessen.

Untersuchungslösungen:

- a. pH 1,0: 0,1 N Salzsäure
- b. pH 4,5: Azetatpuffer (46)
- c. pH 7,5: Phosphatpuffer (46)
- d. pH 8,5: Britton-Robinson-Puffer I (46)

6.2. Einnahme und Harnentnahme

Die Probanden nahmen die Substanz morgens nüchtern ein und tranken dazu 200 ml Wasser. Nach 2 Stunden erfolgte ein leichtes Frühstück. Nach jeder Harnentnahme wurden 50 ml Wasser verabreicht. Die Probanden wurden angehalten, während der Versuchsdauer keine weiteren Getränke und nur leichte Kost zu sich zu nehmen. Vor der Einnahme der Substanz wurde die Blase entleert, diese Urinfraktion diente als Nullprobe. Die Harnentnahme erfolgte in 4 mal halbstündlichen, 8 mal stündlichen und dann 5-stündlichen Abständen. Die Entnahme wurde über 30 Stunden durchgeführt.

6.3. Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn

Im gesammelten Harn wurden die Gesamtsalicylate nach Levy (42) bestimmt.

3,0 ml Harn wurden mit 3,0 ml konzentrierter Salzsäure in Ampullen von 10 ml 16 Stunden bei 100° hydrolysiert. Der gesamte Ampulleninhalt wurde mit 30,0 ml Tetra-chlorkohlenstoff 5 Minuten extrahiert. 10 ml der organischen Phase wurden durch Natriumsulfat filtriert und anschliessend mit 5,0 ml Eisen(III)-Reagenzlösung unter 5-minütigem Schütteln zur Reaktion gebracht. Die Extinktion der wässrigen Phase wurde bei 530 nm in 1 cm Küvetten nach 20 Minuten gemessen.

Eisen(III)-Reagenzlösung: 5 ml Stammlösung werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Stammlösung: 1,0 g Eisen(III)-Nitrat ad 100 ml mit 0,07 N Salpetersäure.

7. "Buccal-Test" nach Beckett und Triggs

7.1. Herstellung der Stammlösungen

Lösung a: Es wurden 10 mg reine Salicylsäure in 100 ml Pufferlösung unter Erwärmen gelöst.

Lösung b: Es wurden 40 mg Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt unter Erwärmen in 100 ml Pufferlösung gelöst.

Die Herstellung der Pufferlösungen erfolgte nach Britton-Robinson (46).

7.2. Applikation und Aufbereitung der Proben

Nach zweimaligem Spülen des Buccalraumes mit je 25 ml Pufferlösung wurden 25 ml Stammlösung während 5 Minuten im Munde durch Bewegungen der Wangen umgeschwenkt, wobei durch leichtes Neigen des Kopfes nach vorne ein versehentliches Verschlucken von Stammlösung vermieden wurde. Anschliessend wurde die Buccalflüssigkeit in ein Becherglas eingebracht, der Buccalraum wurde mit 2 mal 25 ml Pufferlösung jeweils 10 Sekunden lang nachgespült. Sodann wurde der Gehalt der Versuchslösung an Salicylsäure gegen eine gleich behandelte Menge Stammlösung ermittelt.

7.3. Gehaltsbestimmung der Buccalflüssigkeit

20 ml der zu 100 ml aufgefüllten Buccalflüssigkeit wurden nach Versetzen mit 5 ml konzentrierter Salzsäure mit 30 ml Tetrachlorkohlenstoff 5 Minuten extrahiert. Nach Trennung der stark schäumenden Schichten durch Zentrifugieren (5 Min. bei 3000 U/Min.) wurden 20 ml der organischen Phase mit 5 ml Eisen(III)-Reagenzlösung unter 5-minütigem Schütteln zur Reaktion gebracht. Die Extinktion der wässrigen Phase wurde bei 530 nm in 1 cm Küvetten nach 20 Minuten gegen gleich-behandelte Stammlösung gemessen.

8. Untersuchungen an Salben

8.1. Verwendete Salbengrundlagen

Als Salbengrundlagen wurden verwendet:

- a. Wasserhaltiges Eucerin^R Beiersdorf
- b. Wasserhaltige hydrophile Salbe DAB 7,
ohne Konservierungsstoff
- c. Vaseline DAB 7
- d. Polyäthylenglykosalbe DAB 7

8.2. Herstellung der Salben

Mit allen Grundlagen wurden je 3 Salben hergestellt, enthaltend

- a. 5 % reine Salicylsäure
- b. 20 % Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt,
entsprechend 5 % Salicylsäure
- c. 5 % Salicylsäure und 15 % Desoxycholsäure
im physikalischen Gemisch

Das Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt wurde in mikronisierter Form eingesetzt; Die Salben wurden während 5 Minuten im Handmörser verrieben und dann zweimal über die Dreiwalzenmühle gegeben.

8.3. Diffusionskammer und Messung der Arzneistofffreigabe in vitro

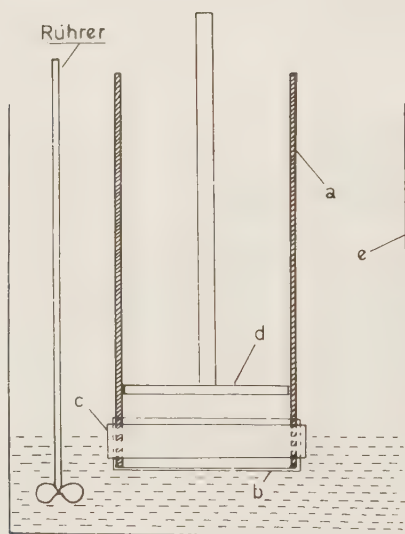


Abb. 35: Diffusionskammer zur Messung der Arzneistofffreigabe aus Salben in vitro. a Glasrohr, b Dialysemembran, c Plastikring, d Glasscheibe, e Untersuchungsgefäß.

Ueber ein Glasrohr (a) von 10 cm Höhe und einem Durchmesser von 7 cm (Abb. 35) wurde eine Dialysemembran (b), Firma Schleicher und Schüll, Nr.608 gespannt und mit Hilfe eines aufgesetzten Plastikringes (c) fixiert. 5 g Salbe wurden in das so entstandene Gefäß eingewogen und mit Hilfe einer aufgedrückten Glasscheibe (d) mit Stiel zu einer dünnen, gleichmässigen Schicht verteilt. Der gesamte Zylinder wurde in ein mit 350 ml 0,1 N Salzsäure gefülltes Gefäß (e) eingehängt. Mit Hilfe eines Thermostaten wurde die Temperatur der Salzsäure bei 37° gehalten, die Flüssigkeit wurde mit einem dreiflügligen Propellerrührer ständig mit 60 U/Min. umgerührt. Nach 1, 3, 5, 10, 20 und 24 Stunden wurden 5 ml der Lösung abpipetiert und bei 305 nm photometrisch gemessen.

8.4. Bestimmung der freien Salicylsäure in der Salbe

Die jeweilige Salbe wurde in 50,0 ml 0,1 N Salzsäure bei 50° 5 Minuten lang kräftig ausgeschüttelt, das erkaltete Gemisch wurde filtriert und das Filtrat mit 0,1 N Natronlauge gegen Phenolphthalein titriert. Vor dem Versuch wurden ein Blindwert ermittelt und die Ausschüttelausbeute ermittelt, indem eine Gehaltsbestimmung einmal mit der Grundlage alleine und einmal mit der Grundlage plus 5 % inkorporierter Salicylsäure vorgenommen wurden.

8.5. Lagerung der Salben

Die Salben wurden zur 24-stündigen Lagerung auf eine Glasplatte ausgestrichen und bei 37° im Trockenschrank aufbewahrt. Zur 8-wöchigen Lagerung wurden die Salben bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluss aufbewahrt.

8.6. Versuchspersonen

An den Versuchen nahmen 6 Versuchspersonen teil. Die Probanden 1-3 erhielten die Zubereitungen a, b und c auf wasserhaltigem Eucerin^R, die Probanden 4-6 erhielten die Zubereitungen a, b und c mit Wasserhaltiger hydrophiler Salbe.

Proband	1	2	3	4	5	6
Alter Jahre	28	26	24	27	28	25
Geschlecht	♂	♀	♀	♂	♂	♀
Gewicht kg	80	69	67	70	80	58

Behandelte Fläche: Einheitlich 12 mal 12 cm.

8.7. Applikation und Harnentnahme

Alle Probanden applizierten 5,0 g der entsprechenden Salbenzubereitung durch 10-minütiges sanftes Einreiben auf eine 12 mal 12 cm grosse Fläche der Bauchdecke. Anschliessend wurde die gesamte Fläche mit einer Plastikfolie abgedeckt und mit Leukoplast fixiert, um ein Verrutschen und Abtragen durch Kleidungsstücke zu vermeiden. Kost- und Flüssigkeitsaufnahme erfolgten wie bei der oralen Applikation, auf den Zustande der Nüchternheit vor dem Versuch wurde jedoch verzichtet. Die Harnentnahme erfolgte 6 mal stündlich, dann nach Bedarf über einen Zeitraum von 42 Stunden.

8.8. Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn

Die Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn erfolgte wie unter 6.3. angegeben, jedoch unter Verwendung des gesamten Ampulleninhalts.

9. Rektale Applikation

9.1. Herstellung der Suppositorien

Die für jeweils 10 Suppositorien genau abgewogene Menge Substanz wurde mit geschmolzener Grundmasse Stadimol^R auf 20 g aufgefüllt und im Handmörser innig und gleichmässig vermengt. Die Suppositorien wurden im Cremeschmelzverfahren hergestellt und anschliessend durch Abschaben auf ein Gewicht von 2 g gebracht. Jedes erste Zäpfchen wurde appliziert, jedes zweite Zäpfchen wurde einer Gehaltsbestimmung unterzogen.

9.2. Gehaltsbestimmung der Suppositorien

1 Suppositorium wurde in 15,0 ml Methylenchlorid gelöst; anschliessend wurden 15,0 ml Aethanol 70 % und 0,25 ml Phenolphthaleinlösung zugegeben und mit 0,1 N NaOH titriert. Als Blindwert diente je ein Suppositorium aus reiner Grundmasse bzw. aus Grundmasse mit einer entsprechenden Menge Desoxycholsäure.

9.3. Applikation und Harnentnahme

Als Versuchspersonen stellten sich 5 gesunde Doktoranden im Alter von 25 bis 30 Jahren zur Verfügung, 4 davon weiblich, einer männlich. 3 Probanden erhielten Suppositorien mit je 400 mg Salicylsäure-Desoxycholsäure-Addukt mikrofein, enthaltend je 100 mg Salicylsäure, 2 Probanden erhielten Suppositorien mit je 200 mg mikrofeinem Addukt, enthaltend 50 mg Salicylsäure. Als Vergleichswert diente eine Versuchsreihe mit entsprechenden Salicylsäure-

Suppositorien. Die Diäten und Aktivitäten der betreffenden Personen wurden nicht standardisiert.

Die Applikation wurde nach Entleerung des Darmes vorgenommen; während der folgenden 24 Stunden wurde Stuhlgang vermieden. Die Harnentnahme erfolgte nach 30 und 60 Minuten, dann stündlich bis zur 6.Stunde, später nach Bedarf. Die Probanden entleerten vor Versuchsbeginn die Blase; diese Fraktion diente als Nullprobe.

9.4. Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn

Die Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn erfolgte wie unter 8.8. angegeben.

IV. Literaturverzeichnis

1. Cramer, F., Einschlussverbindungen, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954
2. Schlenk jr., W., Fortschr. chem. Forsch. Bd. 2, 92 (1951)
3. Schlenk jr., W., Liebigs Ann. Chem. 565., 204 (1949)
4. Broser, W. und Lautsch, W., Naturwissenschaften 40., 220, (1953)
5. Gawalek, G., Einschlussverbindungen-Additionsverbindungen-Clathrate, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969
6. Sandmann, R., Dissertation FU Berlin 1970 und
Frömming, K. H. und Sandmann, R., Arch. Pharmaz. 303., 4, 371-378
7. Cramer, F., Naturwissenschaften 38., 188 (1951)
8. Scheibe, G. und Brück, D., Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. physik. Chem. 54., 403 (1950)
9. Weyermann, I., Dissertation FU Berlin 1971
10. Frömming, K. H., Arch. Pharmaz. 301., 548 (1968)
11. Frömming, K. H., Dtsch. Apotheker Ztg., 109., 309 (1969)

12. Frömming, K. H., Sandmann, R. und Wenzel, M., *Arzneim. forsch.* 20., 1716 (1970)
13. Frömming, K. H. und Sandmann, R., *Arch. Pharmaz.* 303., 371 (1970)
14. Wieland, H. und Sorge, H., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 97., 1 (1916)
15. Latschinoff, P., *Ber. dtsh. chem. Ges.* 18., 3039 (1885)
16. Huntress, E. H. und Phillips, R. W., *J. Amer. chem. Soc.* 71., 458 (1949)
17. Rheinboldt, H., Braun, P., Flume, E., König, O. und Lauber, A., *J. prakt. Chem.* 153., 313 (1939)
18. Rheinboldt, H., König, O. und Otten, R., *Liebigs Ann. Chem.* 473., 249 (1929)
19. Buu-Hof, N. P., *Hoppe Seyler's Z. physiol. chem.* 278., 230, (1943)
20. Shimizu, T. und Hatakeyama, T., *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 182., 57 (1929)
21. Marx, W. und Sobotka, H., *J. org. Chemistry* 1., 275 (1936)
22. Rheinboldt, H., Pieper, H. und Zervas, P., *Liebigs Ann. Chem.* 451., 256 (1927)
23. Sobotka, H. und Goldberg, A., *Biochem. J.* 26., 555 (1932)
24. Cilento, G., *J. Amer. chem. Soc.* 72., 4272 (1950)

25. Cilento, G., J. Amer. Chem. Soc. 73., 1355 (1951)
26. Lautsch, W., Bandel, W. und Broser, W., Z. Naturforsch.
11 B., 282 (1956)
27. Cilento, G., J. Amer. Chem. Soc. 74., 968 (1954)
28. Angelescu, E. und Nicolau, G., Rev. Roumaine Chim.
10., 355 (1965)
29. Sobotka, H. und Kahn, S., Biochem. J. 26., 898 (1932)
30. Sobotka, H., Chem. Reviews 15., 340 (1934)
31. Rheinboldt, H., König, O. und Flume, E., Hoppe-Seyler's
Z. physiol. Chem. 184., 219 (1929)
32. Fieser, L. F. und Newmann, M. S., J. Amer. chem. Soc.
57., 1602 (1935)
33. Wakely, R. D., Amer. Patent 2. 758. 923 vom 14.8.1956
ref.: C 1958, 7844
34. Rheinboldt, H., Liebigs Ann. Chem. 451., 256 (1927)
35. Kratky, O. und Giacomello, G., Mh. Chem. 69., 427 (1936)
36. Caglioti, V. und Giacomello, G., Gazz. chim. ital.
69., 245 (1939)
37. Fischmeister, H., Mh. Chem. 85., 182 (1954)
38. Almquist, H. J. und Klose, A., J. Amer. chem. Soc.
61., 745 (1939)

39. Münzel, K., Arch. Pharmaz. 293., 766 (1960)
40. Levy, G. und Hollister, L. E., J. pharmac. Sci. 53.,
1446 (1964)
41. Münzel, K., Arch. Pharmaz. 293., 766 (1960)
42. Levy, G. und Procknal, J. A., J. pharmac. Sci. 57.,
1330 (1968)
43. Forth, W., Rummel, W., Glasner, H. und Andres, H.,
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol.
Pharmakol. 254., 364 (1966)
44. Feldmann, S., Wynn, R. J. und Gibaldi, M., J. pharmac.
Sci. 57., 1493 (1968)
45. Wieland, H. und Sorge, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol.
Chem. 97., 1 (1916)
46. Rauen, H. M., Biochem. Taschenbuch, 2. Teil S. 92
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964
47. Ritschel, W. A. und Orth, H., Pharmaz. Ind. 28., 464 (1966)
48. Münzel, K., Büchi, J. und Schultz, O. E., Galenisches
Praktikum, Wissensch. Verlagsgesellschaft
m.b.H. Stuttgart (1959), S. 465
49. Perrin, J., J. Pharmacy Pharmacol., 19., 25 (1967)
50. Dibbern, H. W., Arzneim. forsch. 16., 177 (1966)
51. Stricker, H., Pharmaz. Ind. 33., 446-454 (1971)

- 52. Sartorius Resorptionsmodell SM 16750, Fa. Sartorius,
Göttingen
- 53. Stricker, H., Pharmaz. Ind. 33., 157 (1971)
- 54. Dolusio, J. T. und Switosky, J. V., J. Pharmac. Sci.
54., 1594 (1965)
- 55. Schanker, L. S., Shore, P. A., Brodie, B. B. und Hogben,
C. A., J. Pharmacol. 120., 528 (1957)
- 56. Brodie, B. B. und Hogben, C. A., J. Pharmacy Pharmacol.
9., 345 (1957)
- 57. Meyer, H. H., Arch. exp. Path. 42., 109-118 (1899)
- 58. Overton, E., Studien über Narkose, Gustav-Fischer
Verlag Jena (1901)
- 59. Höber, R. und Höber, J., J. Cell. comparat. Physiol.
10., 401-422 (1937)
- 60. Gibaldi, M. und Kanig, J. L., J. oral Ther. Pharmacol.
1., 440-450 (1965)
- 61. Walton, R. P. und Lacy, C. F., J. Pharmacol. exp.
Therapeut. 54., 61-76 (1962)
- 62. Overton, E., Pflügers Archiv ges. Physiol. 92.,
115-280 (1902)
- 63. Schanker, L. S., J. med. pharmac. Chem. 2., 343 (1960)
- 64. Beckett, A. H. und Triggs, E. J., J. Pharmacy Pharmac.
19., Suppl. 31 S - 41 S (1967)

65. Ritschel, W. A., Clotten, R., *Arzneim. forsch.* 19., 349
(1969)
66. Lien, E., Koda, R. T. und Tong, L. G., *Drug Intell. Clin.
Pharm.* 5., 2, 38-41 (1971)
67. Taraszka, M. J., *J. Pharmac. Sci.* 59., 873 (1970)
68. Borgström, B., "Intestinal Function of Bile", aus "Digestion
and Intestinal Absorption", 7 th Intern Congress
of Clinical Chemistry, Genf 1969, Verlag
S. Karger, Basel (1970)
69. Münzel, K., Büchi, J. und Schultz, O. E., *Galenisches
Praktikum, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
m.b.H., Stuttgart* 1965, S. 680
70. Wand, R. A. und Ramsay, A., *Canad. Med. Ass. J.*,
48., 121 (1943)
71. Levy, B. und Huyck, C., *J. Amer. Pharmac. Ass.* 38., 611
(1949)
72. Lockie, L. D. und Sprowls, J. B., *J. Amer. Pharmac. Ass.*
38., 222 (1949)
73. Billups, N. F. und Patel, N. K., *Amer. J. of Pharmac. Educ.*
34., 190 (1970)
74. Ducommun, F., *Pharmac. Acta Helv.*, 25., 1 (1950)
75. Schulte, K. E. und Sachse, J., *Pharmazie* 20., 412, 497 (1965)
76. Richter, G., *Arzneim. forsch.* 7., 427 (1957)
77. Büchi, J. und Schlumpf, R., *Pharmac. Acta Helv.* 19., 171
(1944)

78. Monocarp, C., Arch. exper. Path. Pharmac. 141., 50, 87
(1929)
79. Polano, M. K., Bonsel, J., Van der Meer, B. J.,
Dermatologica 101., 69 (1950)
80. Kedvessy, G. und Bognar, K., Pharmaz. Zentralhalle
97., 66 (1958)
81. Richter, G., Arzneim. forsch. 7., 419 (1957)
82. Tawashi, R. und Speiser, P., Pharmac. Acta Helv. 37, 88
(1962)
83. Gstirner, F. und Elsner, R., Arneim. forsch. 14., 281 (1964)
84. Münzel, K., aus Jucker, E., Fortschritte der Arzneimittelforschung Bd. 10, Birkhäuser Verlag
Stuttgart 1966, S. 317
85. Valette, G., Pharmac. J. 170., 461 (1961)
86. Kalbhen, D. A., Pharmaz. Zeitg. 106., 1447 (1961)
87. Gstirner, F., Grundstoffe und Verfahren der Arzneibereitung,
F. Enke Verlag, Stuttgart 1960, S. 483
88. Henning, W., Ueber die rektale Resorption von Medikamenten,
Juris Verlag, Zürich 1959, zitiert aus Arzneim.
forsch. 14., 1029 (1964)
89. Mühlemann, H. und Neuenschwander, R. H., Pharmac. Acta
Helv. 31., 305 (1965)

90. Weiss, A. L. und Sciarrone, B. J., J. Pharmac. Sci.
58., 980 (1969)
91. Münzel, K., Büchi, J. und Schultz, O. E., Galenisches
Praktikum, Wissenschaftliche Verlagsgesell-
schaft m.b.H. Stuttgart 1959, S. 680
92. Czetsch-Lindenwald, H.v., Suppositorien, Editio Cantor,
Aulendorf i. Württ. 1958
93. Schwarz, T. W. und Bichsel, K., Pharmac. Acta Helv.
38., 861 (1963)

Lebenslauf

Am 12. Januar 1943 als zweiter Sohn des Chemikers Dr. Gerhard Lix und seiner Ehefrau Gertraude, geb. Brumme geboren, besuchte ich von 1949 bis 1953 die Volksschule am Winthirplatz zu München. Anschliessend kam ich an die Rupprecht-Oberrealschule in München, wo ich am 18. Juli 1962 die Reifeprüfung bestand. Nach zweijährigem Praktikum in der Isenstein-Apotheke in München bestand ich am 21. September 1964 das pharmazeutische Vorexamen.

Nach zwei Semestern naturwissenschaftlichem Studium begann ich zum Sommersemester 1966 das Studium der Pharmazie an der Universität München, das ich am 15. Oktober 1969 mit dem Staatsexamen abschloss.

Am 20. November 1969 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming die vorliegende Dissertation.

Die Bestallung als Apotheker erhielt ich mit Wirkung vom 18. Dezember 1970.

